

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PHALLOPORINS,
EINES IONENKANAL-BILDENDEN PROTEINS AUS AMANITA PHALLOIDES

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Inge Helbig

Bochum 1988

INTERNATIONALS DES RECHTENS UND VERGLEICHENDES RECHT
UND VERGLEICHENDES RECHT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PHALLOPORINS,
EINES IONENKANAL-BILDENDEN PROTEINS AUS AMANTA PHALLOIDES

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Inge Helbig

Bochum 1988

Referent:

Prof. Dr. G. Boheim

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. W. Oettmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 1988

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
11	Biologische Grundlagen	1
111	Typen	4
112	Wachstumsstadien	5
12	Entwicklungsstadien, Faktoren u.a. Beschreibung von Tieren	7
13	Wachstums, vererbte Merkmale, Färbung und Zeichnung	8
131	Formfaktoren	14
132	Farbfaktoren wie Anlagengröße	14
133	Farbfaktoren wie Färbungsintensität	15
134	Strukturmerkmale	15
135	Strukturmerkmale	15
14	Vererbung	16
141	Vererbung	16
142	Vererbung	16
143	Vererbung	16
144	Vererbung	16
145	Vererbung	16
146	Vererbung	16
147	Vererbung	16
148	Vererbung	16
149	Vererbung	16
150	Vererbung	16
151	Vererbung	16
152	Vererbung	16
153	Vererbung	16
154	Vererbung	16
155	Vererbung	16
156	Vererbung	16
157	Vererbung	16
158	Vererbung	16
159	Vererbung	16
160	Vererbung	16
161	Vererbung	16
162	Vererbung	16
163	Vererbung	16
164	Vererbung	16
165	Vererbung	16
166	Vererbung	16
167	Vererbung	16
168	Vererbung	16
169	Vererbung	16
170	Vererbung	16
171	Vererbung	16
172	Vererbung	16
173	Vererbung	16
174	Vererbung	16
175	Vererbung	16
176	Vererbung	16
177	Vererbung	16
178	Vererbung	16
179	Vererbung	16
180	Vererbung	16
181	Vererbung	16
182	Vererbung	16
183	Vererbung	16
184	Vererbung	16
185	Vererbung	16
186	Vererbung	16
187	Vererbung	16
188	Vererbung	16
189	Vererbung	16
190	Vererbung	16
191	Vererbung	16
192	Vererbung	16
193	Vererbung	16
194	Vererbung	16
195	Vererbung	16
196	Vererbung	16
197	Vererbung	16
198	Vererbung	16
199	Vererbung	16
200	Vererbung	16

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Biologische Membranen	1
1.1.1 Carrier	5
1.1.2 Membrankanäle	6
1.2 Elektrophysiologische Methoden zur Untersuchung von Kanälen	9
1.3 Wasserlösliche, kanalbildende Proteine und Polypeptide	11
1.3.1 Hämolyse	13
1.3.1.1 Phallolysin aus <i>Amanita phalloides</i>	14
1.3.2 Phalloporin aus <i>Amanita phalloides</i>	15
1.3.2.1 Einzelkanalverhalten	15
1.3.2.2 Inkorporationsverhalten	17
1.4 Problemstellung	24
2. Material und Methoden	27
2.1 Präparative Methoden	28
2.1.1 Gewinnung des Phalloporins und Phallolysins aus wäßrigen Extrakten von <i>Amanita phalloides</i>	28
2.1.2 Ammoniumsulfatfällung	28
2.1.3 Präparative Gelfiltration	29
2.1.4 Isolierung des Phalloporins durch differentielle Zentrifugation	29
2.1.5 DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren	30
2.1.6 Präparative Gelelektrophorese des FII-Pools	32
2.1.7 Methanol-Präzipitation von Phalloporin und Phallolysin	32
2.2 Analytische Methoden	33
2.2.1 Messung der spezifischen Kanaleinbaurate	33
2.2.1.1 Grundlagen zur Methodik	33
2.2.1.2 Herstellung der Teflonsepten und mechanischer Aufbau	37
2.2.1.3 Elektronischer Aufbau	40
2.2.1.4 Versuchsdurchführung	44
2.2.1.5 Vorzeichenkonvention	45
2.2.2 Messung der Hämolyseaktivität	45
2.2.3 Gelfiltration über Sephadex G-100	46
2.2.4 Gelfiltration über Sephacryl S-300	46
2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)	47
2.2.6 Native Gelelektrophorese nach Kühn et al. (1980)	48
2.2.7 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	50

	Seite
2.2.8	Proteinbestimmungen 50
2.2.9	Proteasebehandlung von Phalloporin und Phallolysin 52
2.2.10	Isoelektrische Fokussierung 52
3.	Ergebnisse 54
3.1	Erste Hinweise auf die Nicht-Identität von Phalloporin und Phallolysin 54
3.1.1	Gelfiltration über Sephadex G-100 54
3.2	Präparative Methoden zur Isolierung und Aufreinigung des Phalloporins 57
3.2.1	Extraktion von Phallolysin und Phalloporin aus Amanita phalloides 57
3.2.2	Ammoniumsulfatfällung 58
3.2.3	Gelfiltration über Sephacryl S-300 60
3.2.4	Isolierung von Phalloporin durch differentielle Zentrifugation 65
3.2.5	DEAE-Ionenaustauschchromatographie 68
3.2.6	Vergleich der präparativen Methoden zur Isolation des Phalloporins 72
3.2.7	Methanol-Präzipitation 74
3.2.7.1	Phalloporin 74
3.2.7.2	Phallolysin 87
3.3	Analytische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung des Phalloporins 90
3.3.1	Analytische Gelfiltration 90
3.3.2	Native Gelelektrophorese 94
3.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese 97
3.4	Präparative Gelelektrophorese zur Identifizierung des Phalloporins 98
3.5	Isoelektrische Fokussierung der FII- und FIV-Probe 101
3.6	Verhalten gegenüber Proteaseabbaue und Hitzebehandlung 101
3.6.1	Proteasen 101
3.6.2	Hitzenaturierung 104
4.	Diskussion 109
4.1	Entdeckung des kanalbildenden Proteins Phalloporin in Amanita phalloides 109
4.2	Isolierung des kanalbildenden Proteins aus Amanita phalloides 110
4.3	Identifizierung und Charakterisierung des Phalloporins 111

	Seite
4.3.1	Aggregationsverhalten und Inkorporation 112
4.3.2	Isoelektrischer Punkt (p.I.) und pH-abhängige Kanalinkorporation 114
4.3.3	Kanalinkorporationsverhalten nach Denaturierung 116
4.3.4	Protease-Resistenz 121
4.4	Der Phalloporin-Ionenkanal im Vergleich zu Ionenkanälen aus Bakterien und Pflanzenzellen 121
4.5	Phalloiysin 126
5.	Zusammenfassung 128
6.	Literaturverzeichnis 130

Abkürzungen

AA	Acrylamid
ADH	Aldehyd-Dehydrogenase
Apo	Apo ferritin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Ammoniumsulfat
bis-AA	N,N'-Methylen-bisacrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin
D	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DOPS	1,2-Dioleoyl-Glycero-3-Phosposerin
E_{280}	Extinktion bei 280 nm
GAPD	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Kat	Katalase
kD	Kilo-Dalton $\approx$ 1 kg/mol
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M_r	relative molare Masse, Molmasse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p.I.	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
POPC	1,2-Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphocholin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMPC	1,3-Stearoyl-3-Myristoyl-Glycero-2-Phosphocholin
TCA	Trichloressigsäure
Thy	Thyroglobulin
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
V_1, V_2	Extraktionsverfahren
VDAC	Voltage-dependent-anion-selective-channel

1. Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Durch Feinstrukturuntersuchungen mit Hilfe der hochauflösenden Elektronenmikroskopie konnte 1959 durch Robertson erstmalig direkt gezeigt werden, daß Zellen und subzelluläre Organellen von scharf begrenzten trilamellaren Schichten, den Membranen, umschlossen werden (Robertson, 1959, 1960). Bis zu diesem Zeitpunkt war die Existenz einer solchen biologischen Membran allein durch indirekte physikalische und physiologische Experimente (Nägeli, 1884; Pfeffer, 1899; Overton, 1902) nachweisbar.

Erste Vorstellungen über den strukturellen Aufbau biologischer Membranen gewannen Gorter und Grendel (1925) durch Spreitungsexperimente mit extrahierten Membranlipiden aus Erythrozytenghosts. Aus dem experimentell erhaltenen Flächenbedarf des auf einer Wasseroberfläche gespreiteten Lipidanteils der Erythrozytenmembranen und der kalkulierbaren Membranoberfläche der Zellen postulierten sie, daß die Lipidmoleküle in Form einer Doppelschicht (Bilayer) angeordnet sein mußten. Aufgrund des amphipathischen Charakters der Membranlipide, vor allem der Phospholipide, ist der aus zwei monomolekularen Lipidschichten bestehende Bilayer derartig organisiert, daß jeweils die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten gegeneinanderzeigen und die polaren Köpfe in die wäßrige Phase ragen.

Unter Berücksichtigung der biochemisch nachweisbaren Proteinbestandteile biologischer Membranen erweiterten Danielli und Davson (1935) die hypothetische Doppelschichtstruktur zum sogenannten "Sandwich-Membranmodell". Der kontinuierlichen Kohlenwasserstoffphase des Bilayers war nach ihren Vorstellungen jeweils eine monomolekulare Schicht von Proteinen aufgelagert. Diese Struktur ließ sich bemerkenswert gut mit dem von Robertson dargestellten elektronenmikroskopischen Bild der Zellmembran vereinbaren. Man vermutete, daß der elektronendurchlässige, transparente Zwischenraum von 3 - 6 nm der hydrophoben Kohlenwasserstoffphase entsprach, während die beiden elektronendichten Linien von 3 - 4 nm Breite die Proteine und die hydrophilen Teile der Lipide darstellten. Da diese trilamellare Feinstruktur in ultradünnen Schnittpräparaten vieler verschiedener Typen von tierischen und pflanzlichen Zellen, intrazellulären Organellen und Membransystemen zu finden war, bezeichnete man dieses einheitliche strukturelle Grundkonzept als Einheitsmembran oder "unit-membrane" (Robertson, 1959).



Viele in der Folgezeit detailliert untersuchten Funktionen und Eigenschaften biologischer Membranen konnten mit dem einfachen Membranmodell nicht ausreichend erklärt werden. Um den neueren Befunden Rechnung zu tragen, entwickelten Singer und Nicolson (1972) das Fluid-mosaic-membrane-Modell, das in seiner Grundidee auch gegenwärtig von Gültigkeit ist (Abb. 1.1).

Der diesem Modell ebenfalls zugrundeliegende Bilayer aus den Membranlipiden besitzt bei physiologischen Temperaturen keine starre Struktur, sondern bildet eine flüssig-kristalline Matrix, die eine relativ freie Beweglichkeit der einzelnen Lipidmoleküle erlaubt. Die Membranproteine können darin, mosaikartig verteilt, entweder als integrale Proteine den gesamten Bilayer der Dicke nach überspannen oder sind als periphere Proteine durch partielles Eintauchen in die fluide Matrix mit dem Bilayer mehr oder weniger stark assoziiert.

Untersuchungen über die Konformation von Membranproteinen und die Natur ihrer Wechselwirkungen mit Lipiden resultierten in den allgemeingültigen Vorstellungen, daß in die hydrophobe Matrix hineinreichende Teile der Membranproteine selbst stark hydrophob sind, während solche, die zur wäßrigen Phase exponieren, einen hydrophilen Charakter aufweisen.

Die Analyse der Konfiguration der Peptidketten in Membranproteinen mit Hilfe von Infrarot- und NMR-Spektroskopie, optischer Rotationsdispersion und Circular dichroismus führte darüberhinaus zu dem Ergebnis, daß die integrierten Proteinmoleküle einen hohen, α -helikalen Anteil aufweisen und zwischen den helikalen Regionen benachbarter Proteine starke Wechselwirkungen stattfinden können. Durch die je nach Lipidzusammensetzung vorgegebene Membranfluidität sind auch die Proteinmoleküle durch laterale Diffusion relativ frei beweglich in der Membranebene. Daß die Proteine trotzdem nicht homogen über die Membran verteilt sind, sondern mosaikartig zu Proteinaggregaten zusammenfinden, ist zum einen die Folge der obenerwähnten hydrophoben Protein-Proteinwechselwirkungen benachbarter integraler Proteine, zum anderen Folge der elektrostatischen Bindung zu den aufgelagerten peripheren Proteinen, die die Beweglichkeit stark einschränken.

In biochemischer Hinsicht spiegelt sich die Art der Assoziation der Membranproteine durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen mit Lipidmolekülen und anderen Proteinen in ihrer Extrahierbarkeit wieder. Während man ein peripheres Protein allein durch Eingreifen in die elektrostatischen Bindungen - durch Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen und pH-Variationen - von der Membran

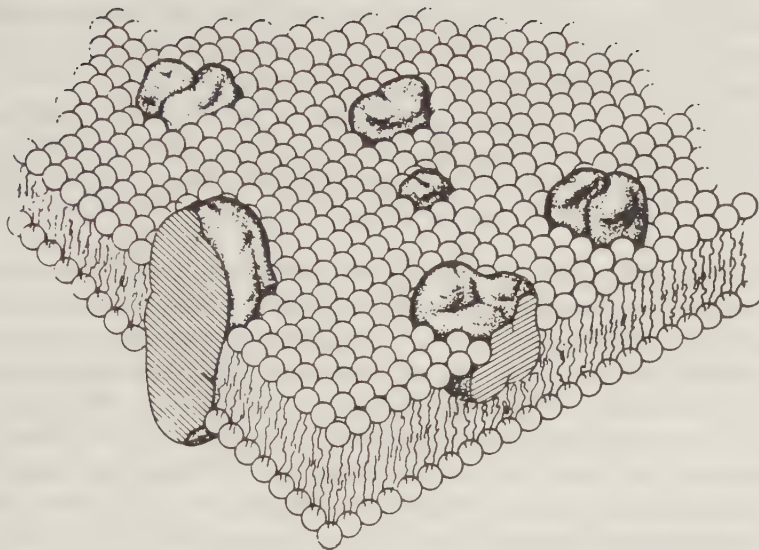


Abb. 11: Das Fluid-mosaic-membran-Modell der Zellmembran
Aus Singer und Nicolson, 1972

ablösen kann, erfordert die Solubilisierung eines integralen Membranproteins mehr oder minder die Zerstörung der Membran mittels Detergenzien.

Chemische Analysen isolierter Zellmembranen haben gezeigt, daß alle Biomembranen Lipide und Proteine enthalten, daß jedoch das Mengenverhältnis Protein zu Lipid sehr unterschiedlich von Zellart zu Zellart sein kann, es schwankt zwischen 0.25 im Myelin und 3.0 in Bakterienmembranen (Korn, 1968). Die am häufigsten vorkommenden Membranlipidarten stellen die Phospholipide, die Sphingomyeline und das Cholesterol dar (Lehninger, 1977). Bei pflanzlichen Zellmembranen ist darüberhinaus ein hoher Anteil von Glycolipiden vorzufinden (Straßburger, 1978).

Phosphoglyceride enthalten als hauptsächliches Bauelement Phosphoglycerin, das mit zwei gleichen oder verschiedenen Fettsäureresten verestert sein kann. Dabei sind die gesättigten Fettsäuren, wie Palmitinsäure ($C_{16:0}$) und Stearinsäure ($C_{18:0}$), sowie die ungesättigte Fettsäure Ölsäure ($C_{18:1}$), am verbreitesten. Als polare Kopfgruppe ist in den Phospholipiden und Sphingomyelinen an die Phosphorsäure ein polarer Rest, wie z. B. Cholin, Äthanolamin oder Serin, gekoppelt. Sphingomyeline, vorzugsweise in Membranen von Gehirn und Nerven anzutreffen, enthalten entsprechend Sphingosin, an dessen Aminogruppen ein Fettsäurerest amidartig gebunden ist und dessen 1-Hydroxylgruppe mit Phosphorsäure verestert ist. Bei den Glycolipiden ist an eine der Hydroxylgruppen des Glycerins anstelle des Phosphatesters ein Zucker glycosidisch gebunden. Das Cholesterol gehört als Steroid zu den Isoprenderivaten.

Alle genannten Lipidarten zeichnen sich durch ihren amphipathischen Charakter aus, d. h. sie besitzen in einem Molekül neben unpolaren Kohlenwasserstoffketten auch mehr oder weniger polare Gruppen. Gerade dieser Struktureigenschaft ist die Fähigkeit zur spontanen Ausbildung lamellarer, bimolekularer Schichten im wäßrigen Milieu zuzuschreiben. Da die unpolaren Kohlenwasserstoffketten aufgrund ihrer Hydrophobizität den Kontakt mit Wasser zu vermeiden suchen, grenzen sie sich durch Selbstaggregation von den Wassermolekülen ab. Für Lipide mit zwei Fettsäureketten ist dabei die oben erwähnte Doppelschichtung die energetisch günstigere Struktur.

Während die Grundstruktur biologischer Membranen durch die Eigenschaften der Membranlipide bestimmt wird, sind für die vielfältigen physiologischen Funktionen vor allem die Proteine verantwortlich.

Eine vorrangige biologische Funktion der Zellmembran ist in der Kompartimentierung zellulärer und subzellulärer Reaktionsräume zu sehen. Mit der Abgrenzung wird ein freier Austausch gelöster Substanzen durch Diffusion eingeschränkt und dadurch die Konstanterhaltung des Zellinhaltes gegenüber dem äußeren Milieu gewährleistet.

Allein lipophilen Substanzen ist es in Abhängigkeit von ihrer Lipidlöslichkeit möglich, die Lipidbarriere der Membran zu penetrieren. Da für den Fortbestand der Zelle ein Ein- und Austritt von vorwiegend hydrophilen Nähr-, Bau- und Abfallstoffen jedoch unerlässlich ist, müssen biologische Membranen u. a. hochspezifische Transportsysteme besitzen, die die Passage wasserlöslicher Substanzen kontrollieren (Diamond und Wright, 1969).

Zur Zeit werden zwei Arten von Transportsystemen diskutiert, die biologischen Membranen die selektive Permeationseigenschaft für diese Substanzen verleihen:

- (1) Intramembranäre bewegliche Carrier
- (2) Transmembranäre Kanalstrukturen

1.1.1 Carrier

Carrier sind spezifische Trägermoleküle in der Membran, die eine Substratspezifität, ähnlich den Enzymen, aufweisen und wie diese aus Proteinen bestehen. Nach allgemeinen Vorstellungen läuft der carriervermittelte Transportprozeß des Substrates, z. B. einem Ion, in folgenden Schritten ab: Das Carriermolekül nimmt an der Grenzfläche Membran - wäßrige Phase ein Ion durch Komplexbildung auf und transferiert die Bindestelle durch Konformationsänderung, Diffusion oder Rotation des Komplexes über die hydrophobe Lipidbarriere zur anderen Seite der Membran, wo das Ion durch Dissoziation wieder freigesetzt werden kann. Der Carrier steht nach entsprechender Rückführung in die Ausgangsposition für einen neuen Transportzyklus bereit. In Analogie zum enzymatischen Prozeß zeichnet sich der Carriermechanismus neben einer hohen Substratspezifität durch eine Sättigungskinetik aus. Aus energetischer Betrachtungsweise können die carriervermittelten Transportprozesse in passive und aktive Systeme eingeteilt werden. Während beim passiven Carriertransport (erleichterte Diffusion) der Transport ohne direkten Energieverbrauch entlang eines bestehenden Konzentrationsgradienten erfolgt, erlaubt der aktive Transport unter Aufwendung von Stoffwechselenergie den Transport von Substanzen gegen ihren elektrochemischen Gradienten.

Als gut untersuchtes Beispiel für einen passiven Carriermechanismus sei hier das antibiotisch wirksame Valinomycin genannt, das einen sehr spezifischen Komplex mit K^+ -Ionen eingeht und dadurch die Membranleitfähigkeit für dieses Ion in biologischen und künstlichen Lipidmembranen um mehrere Größenordnungen erhöht (Muel-ler und Rudin, 1967, Shemyakin et al., 1969).

Die in allen tierischen Zellmembranen nachweisbare Na^+, K^+ -Pumpe kann als Beispiel für einen aktiven Carriermechanismus angesehen werden. Unter Hydrolyse von ATP werden gleichzeitig Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus- und K^+ -Ionen in die Zelle hineingepumpt (Kyte, 1972).

1.1.2 Membrankanäle

Nicht alle Transportphänomene an biologischen Membranen können mittels eines carriervermittelten Stofftransportes hinreichend erklärt werden. Bei der Muskel- und Nerven-erregung werden z. B. sehr schnelle Leitfähigkeitsänderungen der Membran durch hohe Ionenströme gefordert, die ein Carriermechanismus mit einer maximalen Wechselzahl von 10^4 Ionen pro Sekunde nicht zu erzielen vermag (Hodgkin und Huxley, 1952, Läuger und Stark, 1970). Eine Reihe von Untersuchungen deuteten darauf hin, daß Kanäle, die eine wassergefüllte oder hydrophile Pore in der Lipidmembran bilden, die elektrophysiologisch charakterisierten Permeabilitätsänderungen erregbarer Zellmembranen bewirken.

Hodgkin und Huxley konnten schon 1952 zeigen, daß die bei der Entstehung von Aktionspotentialen auftretenden Ionenströme auf unabhängig voneinander agierende Ionenkanäle zurückzuführen sind. Diese Ionenströme erwiesen sich darüberhinaus durch spezifische Toxine einzeln blockierbar, aus der geringen Anzahl an Bindungs-plätzen der Toxine in der Membran konnte man schließen, daß eine begrenzte Anzahl von Kanälen die relativ großen Ionenströme transportierten (Levinson und Me-wes, 1975). Aus den Blockierungsexperimenten konnte pro Einzelkanal eine Wechselzahl von 10^7 Ionen pro Sekunde postuliert werden. Für eine Durchtrittsrate dieser Größenordnung kommt, wie oben schon erwähnt, ein carriervermittelter Transportme-chanismus daher nicht in Betracht.

Der derzeitigen Vorstellung entsprechend, besteht ein biologischer Kanal aus einem Protein oder einem Aggregat aus mehreren Proteinuntereinheiten, die als integrale Proteine die Lipidmembran überspannen. Im leitenden Zustand bildet der Kanal eine

wassergefüllte Pore, die die Diffusion kleiner hydrophiler Substanzen, z. B. Ionen, angemessener Größe und Ladung entlang ihres elektrochemischen Gradienten erlaubt.

Im einfachsten Fall kann ein Kanal durch Konformationsänderung einen leitenden (offenen) oder einen nichtleitenden (geschlossenen) Zustand annehmen (Läuger, 1983). Das Öffnungs- und Schließverhalten eines Kanals, auch "gating" genannt, kann zum einen über spezifische Liganden, wie Transmitter, Ionen und Toxine, erfolgen, zum anderen durch die an der Membran anliegende elektrische Spannung gesteuert werden.

Einer der am besten untersuchten ligandenabhängigen Ionenkanäle ist der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nAChR) in der neuromuskulären Endplatte (Katz 1966; Sakmann et al., 1985). Durch Bindung des chemischen Transmitters Acetylcholin an die postsynaptischen Rezeptormoleküle werden die nAChR-Kanäle geöffnet und verursachen durch den Einstrom positiver Ionen die Depolarisation der Membran. Auf diese Weise wird das über den Neurotransmitter vermittelte chemische Signal in einen elektrischen Impuls transformiert.

In Muskeln von Invertebraten (Stettmeier et al., 1983) und Zentralnervensystem von Säugetieren (MacDonald et al., 1982) konnten kationenselektive Ionenkanäle nachgewiesen werden, deren Schaltverhalten durch den Transmitter Glutamat gesteuert wird. Inhibitorische Transmittersubstanzen, wie GABA und Glycin im Zentralnervensystem von Säugetieren induzieren u. a. das Öffnen chloridselektiver Kanäle in Chromaffinzellen und im Rückenmark (Hamill et al., 1983).

Neben den höhermolekularen Transmittersubstanzen können anorganische Ionen als Ligandenmoleküle funktionieren. Da viele dieser Ionenaktivierten Kanäle in ihrer Schaltkinetik gleichzeitig durch die Membranspannung beeinflusst werden, ist der Übergang zu spannungsaktivierten Ionenkanälen fließend.

Aus der Vielzahl der derzeit untersuchten spannungsabhängigen Kanäle seien hier nur einige stellvertretend genannt:

Der spannungsabhängige Na^+ -Kanal ist für die anfängliche, schnelle Depolarisation während des Aktionspotentials in Nerven-, Skelett- und Herzmuskelzellen verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen wird der Kanal durch depolarisierende Spannungen aktiviert, die dadurch bewirkte kurzzeitige Erhöhung der Na^+ -Permeabilität führt rasch zur weiteren Depolarisation des Membranpotentials. Beim

Erreichen einer Schwellenspannung wird das Aktionspotential ausgelöst. Mit einer zeitlichen Verzögerung setzt die Inaktivierung des Na^+ -Kanals ein.

Für die anschließende Repolarisation zum Ruhezustand der Membran ist ein weiterer spannungsabhängiger Ionenkanal, der verzögernde und gleichrichtende K^+ -Kanal, verantwortlich. Er öffnet sich bei Depolarisation der Membran zeitlich verzögert zum Na^+ -Kanal und gewährleistet den Ausstrom von K^+ -Ionen. Nach Inaktivierung des Na^+ -Kanals läßt der K^+ -Ausstrom das Membranpotential wieder auf negative Werte absinken (Duval und Leoty, 1978).

An verschiedenen Präparationen, wie kultivierten Chromaffinzellen (Marty, 1981), kultivierten embryonalen Rattenmuskelzellen (Methfessel und Boheim, 1982) und adulten Skelettmuskeln (Miller et al., 1985) konnte ein Ca^{++} -abhängiger K^+ -Kanal nachgewiesen werden. Er repräsentiert den Typus eines sowohl liganden-, als auch spannungsaktivierbaren Ionenkanals, dessen "gating"-Verhalten unter Kontrolle des Membranpotentials und der Ca^{++} -Innenkonzentration steht (Ruff, 1986).

Neben den hochmolekularen, komplexen Transportsystemen, die in ihrer funktionalen Bedeutung eng mit der Muskel- und Nervenenergie verknüpft sind, konnten ionen-permeable Kanäle auch in nichterregbaren Membransystemen nachgewiesen werden:

In der äußeren Membran gram-negativer Bakterien existiert eine Klasse von transmembranären wassergefüllten Ionenkanälen, die Porine, die die passive Diffusion kleiner hydrophiler Substanzen ermöglichen (Schindler und Rosenbusch, 1982; Kobayashi und Nakae, 1985; Benz, 1985).

Schein et al. (1976) entdeckten einen spannungsabhängigen, anionenselektiven Kanal (VDAC) in Mitochondrienmembranen von *Paramecium*, der später von Colombini (1980) auch in der äußeren Mitochondrienmembran aus Rattenleberzellen und *Neurospora crassa* lokalisiert wurde.

Mit zunehmendem Interesse werden seit einigen Jahren die bisher nur wenig bekannten Ionenkanäle höherer Pflanzenzellen untersucht. Eine Variante des VDAC-Kanals in der Mitochondrienmembran von Maiszellen wurde von Colombini (1987) beschrieben.

Die Entwicklung der Patch-clamp-Methode (Kapitel 1.2.1) ermöglichte u. a. die Lokalisation von Ionenkanälen in Protoplasten von Weizenmesophyllzellen (Moran et al., 1984), eines kationenselektiven Kanals im Plasmalemma von *Vicia faba* (Schröder et al., 1984), eines spannungsabhängigen K^+ -Kanals im Tonoplasten von Gerstenmeso-

phylzellen (Kolb et al., 1987) und eines wenig selektiven Ionenkanals im Tonoplasten der Zuckerrübe (Coyaud et al., 1987).

Bei einer Reihe von cytolytischen Substanzen wird als grundlegender Wirkungsmechanismus die Ausbildung von Ionenpermeablen Kanälen vorgeschlagen. Diese zu meist wasserlöslichen Proteine und Polypeptide werden in einem späteren Kapitel ausführlich vorgestellt.

1.2 Elektrophysiologische Methoden zur Untersuchung von Kanälen

Die von Hodgkin und Huxley (1952) angewandte *Voltage-clamp-Methode* eröffnete erstmalig die Möglichkeit zur Messung zeit- und spannungsabhängiger Gesamtströme an erregbaren Membranen. Mit ihrer Hilfe gelang es, die bei der Muskel- und Nervenregung zum Gesamtstrom beitragenden Einzelkomponenten als Na^+ - und K^+ -Ionenströme zu identifizieren.

Die *Blockierungsexperimente* mit hochspezifischen Toxinen bestätigten die Annahme, daß die Na^+ - und K^+ -Ionen durch zwei unabhängige Kanalstrukturen entlang ihrer elektrochemischen Gradienten transportiert werden (Levinson und Mewes, 1975).

Die meßtechnisch limitierte Stromauflösung der *Voltage-clamp-Methode* verhinderte jedoch die Registrierung von Einzelkanälen.

Eine indirekte Methode der Einzelkanalanalyse bietet die *Rausch- oder Fluktuationsanalyse* eines Vielkanalsystems. Vorausgesetzt wird hierbei, daß der Gesamtstrom über die Membran aus der Summe der Ionenströme individueller Kanäle, die im angenommenen einfachen Fall zwischen einem geschlossenen und einem offenen Zustand fluktuieren, resultiert. Aus dem mittleren Gesamtstrom und der Varianz kann durch das statistische Analyseverfahren der Einzelkanalleitwert und die mittlere Lebensdauer des geöffneten Kanalzustands berechnet werden (Neher und Stevens, 1977).

Den ersten direkten Nachweis einzelner Ionenkanäle in Form diskreter Öffnungs- und Schließereignisse in biologischen Membranen ermöglichte die von Neher und Sakmann Mitte der siebziger Jahre entwickelte *Patch-clamp-Methode* (Neher und Sakmann, 1976).

Kleine Membranareale auf der Zelloberfläche können durch das Aufsetzen speziell vorbehandelter Glasmikropipetten (Φ 0.5 - 2 μm) elektrisch isoliert betrachtet werden.

Der Abdichtwiderstand zwischen Membran und Glaspipette kann derzeit einen Wert von 10 - 100 G Ω annehmen; man spricht in diesem Fall von der sogenannten *Giga-seal-Technik* (Hamill et al., 1981). Unter diesen Bedingungen ist der zu messende Pipettenstrom identisch mit dem durch die Membranfläche unter der Pipette fließenden Strom. In Abhängigkeit von der Kanaldichte des untersuchten Membranareals ist es u. U. möglich, die charakteristischen Stromfluktuationen eines einzelnen Kanals mit Hilfe einer hochempfindlichen Meßelektronik als rechteckförmige Stromsignale zu registrieren.

Trotz des enormen Vorteils der Patch-clamp-Methode, Einzelkanäle direkt in der biologischen Membran untersuchen zu können, haben sich alternativ dazu die *Rekonstitutionsversuche* mit künstlichen Lipidmembranen etabliert, da nicht alle biologischen Präparate gleichermaßen gut zugänglich für die Patch-clamp-Methode sind (Hanke, 1985). Darüber hinaus bietet die Rekonstitution von Kanalproteinen in einfache Membranmodellsysteme die Möglichkeit, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Kanalproteinen und ihrer Lipidumgebung zu studieren.

Einige Verfahren zur Herstellung planarer Lipidmembranen als Modellsysteme werden in einem späteren Kapitel detailliert beschrieben. Die aus der Mueller-Rudin- und der Montal-Mueller-Methode resultierenden bimolekularen Lipidschichten sind strukturell und zum Teil in ihren elektrischen Eigenschaften den natürlichen Membranen sehr ähnlich. So liegt die spezifische Membrankapazität der Modellmembranen mit 0,3 - 0,8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (abhängig von der Membrandicke) in der Größenordnung der biologischer Membranen (ca. 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$). Da in den undotierten künstlichen Lipidmembranen die spezifischen Transportsysteme, wie Carrier, Enzyme oder Kanäle fehlen, ist verständlicherweise die spezifische Membranleitfähigkeit mit 10^{-7} - 10^{-8} S/cm^2 (in 1 M Salzlösung) wesentlich kleiner als bei biologischen Membranen. Gerade damit ist jedoch die Voraussetzung geschaffen, einzelne inkorporierte Transportsysteme mit ihrem Effekt auf die Membranleitfähigkeit unter gezielten elektrochemischen Bedingungen zu analysieren.

Das *Inkorporationsverfahren* für die verschiedenen Membrantransportsysteme hängt vor allem von der Wasser- bzw. Lipidlöslichkeit des zu untersuchenden Transportproteins ab. Bei einer Reihe von wasserlöslichen Proteinen und Polypeptiden, wie z. B. antibiotisch wirkenden Toxinen aus Bakterien und Pilzen (Kap. 1.3), ist die Leitfähigkeitserhöhung künstlicher und biologischer Membranen durch Ausbildung von membranüberspannenden Kanälen nachgewiesen worden (Haydon und Hladky 1972,

Boheim, 1974, Hoch et al., 1985). Diese kanalbildenden Substanzen können in ihrer wasserlöslichen Form durch einfache Diffusion aus der wäßrigen Phase in den Bilayer inkorporiert werden. Dieser Einbauprozess kann durch Applikation eines entsprechenden Membranpotentials oder pH-Wertes gefördert werden.

Bei den meisten höhermolekularen Transportsystemen handelt es sich jedoch um integrale Membranproteine, die zum einen extrem wasserunlöslich sind und zum anderen isoliert aus ihrer natürlichen, hydrophoben Lipidumgebung leicht denaturieren. Die Rekonstitution dieser stark hydrophoben Proteine in künstliche Lipidsysteme erfolgt daher entweder durch den Einbau als *detergenzsolubilisierter* Proteine (Schein et al., 1976, Benz et al., 1978) oder mit Hilfe der *Vesikelfusion* (Miller, 1978, Darszon, 1983, Hanke, 1985) in vorgeformte Bilayer. Bei der letztgenannten Methode macht man sich die Eigenschaft von bimolekularen Lipidsystemen, wie planaren Bilayern und Lipidvesikeln, zunutze, unter geeigneten Bedingungen miteinander zu fusionieren (Miller und Racker, 1976, Cohen et al., 1980).

Die Membranproteine können nach diesem Verfahren durch Fusion vesikulärer Membranfragmente aus biologischen Membranen (Cohen et al., 1980) oder proteindotierter Lipidvesikel (Schindler und Quast, 1980, Boheim et al., 1981, Coronado und Latorre, 1983) in die Modellmembran inkorporiert werden.

Eine Kombination der *Patch-clamp-Technik* und der Methodik zur *Darstellung künstlicher Membransysteme* hat sich in jüngster Zeit entwickelt. Durch die Herstellung von künstlichen Lipidmembranen auf Glasmikropipetten kann die durch die Patch-clamp-Technik erzielte hohe elektrische Auflösung mit der Möglichkeit, isoliert rekonstituierte Transportsysteme zu untersuchen, miteinander verbunden werden (Wilmsen et al., 1983, Montal et al., 1983, Coronado und Latorre, 1983, Hanke et al., 1984). Eine Variante dieser kombinierten Methode ist Tank et al. (1982) durch die Anwendung der Patch-clamp-Methode an großen, proteindotierten Liposomen gelungen.

1.3 Wasserlösliche, kanalbildende Proteine und Polypeptide

Bereits vor den Einzelkanaluntersuchungen biologischer Membranproteine mit Hilfe der Rekonstitution und der Patch-clamp-Technik gewannen die Experimente mit niedermolekularen, wasserlöslichen Porenbildnern in planaren Bilayern eine besondere Bedeutung.

Die Komplexität biologischer Kanäle und ihre teilweise schlecht zu handhabende Rekonstitution in künstliche Systeme, erschwerten die detaillierten Beschreibungen der Struktur-Funktionsbeziehungen erheblich, die zumeist wesentlich einfacher aufgebauten, leicht in Modellmembranen zu inkorporierenden, wasserlöslichen Porenbildner dienen daher auch gegenwärtig als Modellproteine, um die grundlegenden Prinzipien von Schaltmechanismen und Ionenselektivitäten analysieren zu können.

Viele dieser hydrophilen kanalbildenden Substanzen, die als antibiotisch wirkende Toxine die Leitfähigkeit von künstlichen und natürlichen Membranen in Form von transmembranären Ionenkanälen erhöhen, werden von Bakterien und Pilzen produziert (Hladky und Haydon, 1970; Jung et al., 1981; Hoch et al., 1985). Zu den wohl bekanntesten Vertretern dieser Porenbildner gehören das aus Kulturen von *Bacillus brevis* isolierte Pentadecapeptid Gramicidin A (Urry, 1971; Barnberg und Läger, 1974) und das aus dem Fadenpilz *Trichoderma viride* isolierte Eicosapeptid Alamethicin (Meyer und Reusser, 1967; Gordon und Haydon, 1972; Eisenberg et al., 1973; Boheim, 1974).

Neben der antimikrobiellen Wirkung dieser Substanzen konnte bei einer Anzahl von wasserlöslichen Toxinen ein cytolytischer Effekt auf verschiedene Zellarten beobachtet werden.

Die lethale Zellschädigung der Cytolysine durch einen membranangreifenden Effekt ist derzeit von vielen Cytolysinen bekannt. Man unterscheidet hinsichtlich der Wirkungsweise der Cytolysine zwei grundlegende Mechanismen (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1983):

- a) Der erste Mechanismus stellt einen direkten enzymatischen Angriff auf die Membranlipide dar, wie er für einige bakterielle und Schlangengift-Phospholipasen (Habermann, 1960 Colley et al., 1973; Verkleij et al., 1973) gefunden wurde.
- b) Beim zweiten Mechanismus handelt es sich um einen nichtenzymatischen Prozeß, der auf einer physikalischen Störung der Lipidbilayerstrukturen beruht. Beim Bienen gift Melittin (Habermann, 1968), dem Fischgift Pardaxin (Pal et al., 1981) und dem Antibiotikum Alamethicin (s. o.) vermutet man, daß diese physikalische Schädigung der Membranstruktur durch eine detergenz-ähnliche Wirkung der Proteine zurückzuführen ist.

Bei einer Reihe von cytolytischen Substanzen, u. a. aber auch beim Melittin und beim Alamethicin, konnte man in Bilayeruntersuchungen einen kanalbildenden Mechanismus nachweisen, der als grundlegender lytischer Prozeß angesehen werden kann. Repräsentativ für derartige wasserlösliche, kanalbildende Cytolysine sind das

α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Bernheimer, 1974; Menestrina, 1986) und die kanalbildenden Colicine A, E_1 und Ia aus *Escherichia coli* (Schein et al., 1978) zu nennen.

1.3.1 Hämolsine

Eine besondere Form der Cytolyse stellt die Hämolyse, d. h. die Lyse roter Blutkörperchen dar. Viele Cytolysine werden aufgrund ihrer ausgeprägten Hämolyseaktivität auch unter dem Oberbegriff der Hämolsine zusammengefaßt. In Analogie zum Cytolysemechanismus konnte bei einer Reihe von Hämolsinen eine Änderung der Membranleitfähigkeit in künstlichen Lipidmembranen auf die Entstehung von Ionenkanälen zurückgeführt werden.

Neben den bereits erwähnten Colicinen (z. B. A, E_1 und Ia) aus *E. coli*, deren kanalbildende Eigenschaften erstmals durch Schein et al. (1978) mit Messungen an planaren Lipidmembranen nachgewiesen werden konnten, wurde von Menestrina et al. (1987) ein hämolytisch aktives Protein mit einer relativen molaren Masse M_r 107k aus *E. coli* untersucht. Ein einzelnes Molekülmonomeres dieses Hämolsins kann kationenselektive Ionenkanäle in planaren Phospholipidmembranen ausbilden. Der Porenbildungsmechanismus zeigt eine ähnliche Spannungsabhängigkeit wie die Colicine, im Gegensatz zu den kanalbildenden Colicinen zeichnet sich das Hämolsin durch einen relativ hohen Einzelkanalleitwert (200 pS in 100 mM NaCl) aus.

Das cytolytische und hämolytische Toxin der Seeanemone *Stoichactis helianthus* (M_r 16k) erhöht drastisch die Permeabilität künstlicher Lipidmembranen durch Ausbildung von transmembranären Kationenkanälen, die ebenfalls einen Einzelkanalleitwert von 200 pS in 100 mM KCl-Lösung annehmen (Michaels, 1979; Varanda und Finkelstein, 1980).

Cytolytische und hämolytische Substanzen sind auch bei einigen höheren Pilzen nachgewiesen worden (Bernheimer und Avigad, 1979). Innerhalb der Gattung *Amanita* konnten u.a. die Hämolsine Phallolysin aus *A. phalloides* und Rubescenslysin aus *A. rubescens* isoliert und teilweise aufgereinigt werden (Seeger et al., 1973; Seeger und Lehmann, 1973; Faulstich und Weckauf-Bloching, 1974; Seeger 1976).

In beiden Fällen konnte bisher der hämolytische Wirkungsmechanismus nicht eindeutig geklärt werden. Elektrochemische Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen mit wäßrigen Extrakten aus den Pilzarten wiesen in beiden die Existenz von kanalbildenden Substanzen auf und ließen damit die Vermutung aufkommen, daß

auch hier der cytolytische Effekt durch die Ausbildung von Ionenkanälen in den Zellmembranen zustande kommt.

Da die Entdeckung der in dieser Arbeit beschriebenen, kanalbildenden Substanz aus *A. phalloides* mit der Untersuchung des hämolysierenden Phallolysins eng verknüpft ist, werden im folgenden Abschnitt kurz einige bekannte Charakteristika des Hämolylysins aufgelistet.

1.3.1.1 Phallolysin aus *Amanita phalloides*

Aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* konnte ein hämolytisch wirkendes Toxin gewonnen werden (Seeger et al., 1973). Das sog. Phallolysin erwies sich als thermo-, alkohol- und säurelabiles, basisches Protein (Seeger et al., 1973; Seeger, 1975) mit einer Molmasse von 34 kD nach SDS-Gelelektrophorese (Faulstich et al., 1983). Neben den roten Blutkörperchen können durch das Phallolysin auch eine große Anzahl anderer Säugetierzellen lysiert werden (Seeger und Lehmann, 1973; Faulstich et al., 1974; Odenthal et al., 1976).

Bei der durch Phallolysin induzierten Hämolyse konnte eine Erhöhung der Kationenpermeabilität der Erythrozytenmembran, vor allem für Na⁺- und K⁺-Ionen, registriert werden (Seitz et al., 1981; Bühring et al., 1983). Dieser Befund und die Tatsache, daß dem Phallolysin weder proteolytische noch phospholipolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Seeger et al., 1973; Seitz et al., 1981), ließ vermuten, daß die cytolytische Wirkung durch die Bildung kationenpermeabler Kanäle in den Zellmembranen verursacht wird (Seitz et al., 1981; Bühring et al., 1983; Faulstich et al., 1983).

Aus diesem Grund wurden von Wilmsen et al. (1985) wäßrige Extrakte aus *Amanita phalloides* an künstlichen, planaren Lipidmembranen auf eine mögliche Inkorporation von Ionenkanälen untersucht. In der Tat war im wasserlöslichen Proteinanteil der Extrakte ein pH- und spannungsabhängiger, kationenpermeabler Ionenkanal nachzuweisen. Er galt zunächst als das elektrisch meßbare Äquivalent zum hämolytisch aktiven Phallolysin (Wilmsen et al., 1985).

In dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, daß es sich bei dem Hämolyysin und dem Kanalbildner aus *Amanita phalloides* um zwei nichtidentische, wasserlösliche Proteine handelt.

1.3.2 Phalloporin aus *Amanita phalloides*

Nachdem sich aus den elektrochemischen Experimenten mit teilweise aufgereinigten Phallolysinpräparationen (Kap. 3.1) die Nichtidentität der hämolysierenden und der kanalbildenden Substanz aufzeigte, wird im Folgenden zur Unterscheidung das Hämolysin weiterhin mit *Phallolysin* und der Kanalbildner mit *Phalloporin* bezeichnet.

Durch die detaillierten Untersuchungen von Wilmsen (1987) ist das Phalloporin sowohl im Einzelkanal- als auch im Vielkanalverhalten charakterisiert worden.

1.3.2.1 Einzelkanalverhalten

In künstlichen Lipidmembranen registriert man nach Inkorporation des Kanalbildners bei entsprechend hoher Stromauflösung diskrete Änderungen der Membranleitfähigkeit in Form rechteckförmiger Stromsignale (Abb. 1.2). In Analogie zu den durch biologische Membrankanäle induzierten Stromfluktuationen (Kap. 1.1.2) öffnet und schließt der Phalloporinkanal nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, wobei im offenen Zustand ein definierter Leitwert in Abhängigkeit von der gewählten Ionenkonzentration angenommen wird.

Über einen längeren Zeitraum betrachtet tritt die Kanalaktivität (Abb. 1.2) in Ereignisgruppen, sog. Bursts, auf. Für den inkorporierten, fluktuierenden Phalloporinkanal können somit mindestens drei Zustände beschrieben werden: ein leitender (R_o) und zwei nichtleitende Zustände (R_c und R_f) wobei R_c als ein geschlossener Zustand innerhalb eines Bursts und R_f als nichtleitender Zustand in den Interburstintervallen definiert wird. Beide nichtleitende Zustände können statistisch durch die unterschiedlich langen mittleren Aufenthaltsdauern unterschieden werden (Wilmsen, 1983, Wilmsen et al., 1985). Zur Charakterisierung des Einzelkanalverhaltens wurde von Wilmsen et al. (1985) die Analyse des Schaltverhaltens auf die Kinetik innerhalb eines Bursts beschränkt.

Der kationenpermeable Ionenkanal aus *Amanita phalloides* zeichnet sich weiterhin in seinem Einzelkanalverhalten vor allem durch seine pH- und Spannungsabhängigkeit aus (Wilmsen, 1983, Wilmsen et al., 1985) und läßt sich damit funktional in die in Kap. 1.1.2 beschriebenen liganden- und spannungsabhängigen Kanaltypen einordnen.

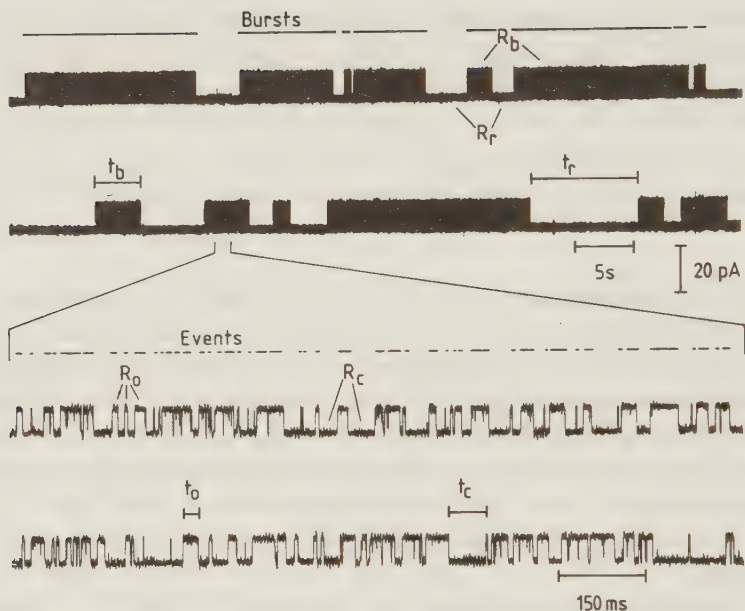


Abb. 1.2 Stromfluktuationsspur eines individuellen Phalloporinkanals

Aus Wilmsen, 1987

Obere Spuren: Über einen längeren Zeitraum betrachtet tritt die Kanalaktivität in Ereignisgruppen ("Bursts") auf. Die Kanalzustände sind mit R_b ("Burst") und R_r ("Interburst") bezeichnet. t_b und t_r geben die Verweildauer im jeweiligen Zustand an. Untere Spuren: Bei höherer Zeitauflösung lassen sich innerhalb eines Bursts die geschlossenen und geöffneten Zustände des Kanals R_o und R_c darstellen.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,3-SMPC, 1,2-DOPS, Cholesterol (γ : 2 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.5

Membranspannung: +98 mV

Temperatur: +37°C

Bei positiven Membranspannungen (Vorzeichen bezogen auf Proteinzugabeseite der Membran) nimmt der Phalloporinkanal vorwiegend den offenen Zustand ein, während er bei negativen Spannungen hauptsächlich in dem nichtleitenden Zustand (R_o) vorliegt (Abb. 1.3).

Parallel dazu, erhöht eine Absenkung des pH-Wertes bei konstanter Membranspannung die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Bei neutralen und alkalischen pH-Werten der Elektrolytlösung bevorzugt der Phalloporinkanal den geschlossenen Zustand (Abb. 1.4). Zwischen den durch Änderung der Membranspannung oder des pH-Wertes verursachten Verschiebungen in der Verteilung von Kanalzuständen besteht eine direkte Korrelation.

Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich beim Phalloporin um einen kationenselektiven Kanal. Er besitzt primär eine hohe Selektivität für monovalente Kationen; zweiwertige Kationen können den Kanal aber ebenfalls in geringerem Maß permeieren. Dagegen ist der Kanal für Chlorid als Anion nahezu impermeabel (Wilmsen, 1983). Der Einzelkanalleitwert in 1 M NaCl-Lösung kann für das Phalloporin mit 52 pS bei 20°C angegeben werden.

1.3.2.2 Inkorporationsverhalten

Das Vielkanalverhalten Phalloporin-dotierter künstlicher Lipidmembranen konnte erst nach der gezielten Untersuchung des spontanen Einbaus der Phalloporinkanäle beschrieben werden. Die spontane Inkorporation der Ionenkanäle erwies sich bei neutralem bis basischem pH-Wert als äußerst gering. Eine drastische Membranleitfähigkeitserhöhung durch nacheinander sich einbauende Kanäle kann erst bei Absenkung des pH-Wertes auf unter 6,5 erreicht werden (Wilmsen, 1987).

Die pH-induzierte Inkorporation von einzelnen Phalloporinkanälen in eine künstliche Membran ist als Originalregistrierung bei hoher Stromauflösung in Abb. 1.5 gezeigt. Die diskreten Stromstufen nach Applikation des Kanalbildners bei niedrigem pH-Wert und konstanter Membranspannung repräsentieren jeweils den Einbau einzelner Kanäle mit entsprechend konstantem Einzelkanalleitwert.

Abb. 1.6 zeigt den Einbaukurvenverlauf des Phalloporins bei geringer Stromauflösung und über einen längeren Zeitraum betrachtet. Nach Zugabe des Kanalbildners zu einem undotierten Bilayer kommt es nach einer kurzen Verzögerungszeit zu einem anfänglich raschen Zuwachs des Membranstromes, der aber mit der Zeit immer langsamer wird und letztlich in eine schwache stetige Drift übergeht. Auch nach mehreren Stunden wird ein konstanter Endwert nicht erreicht (Wilmsen, 1987).

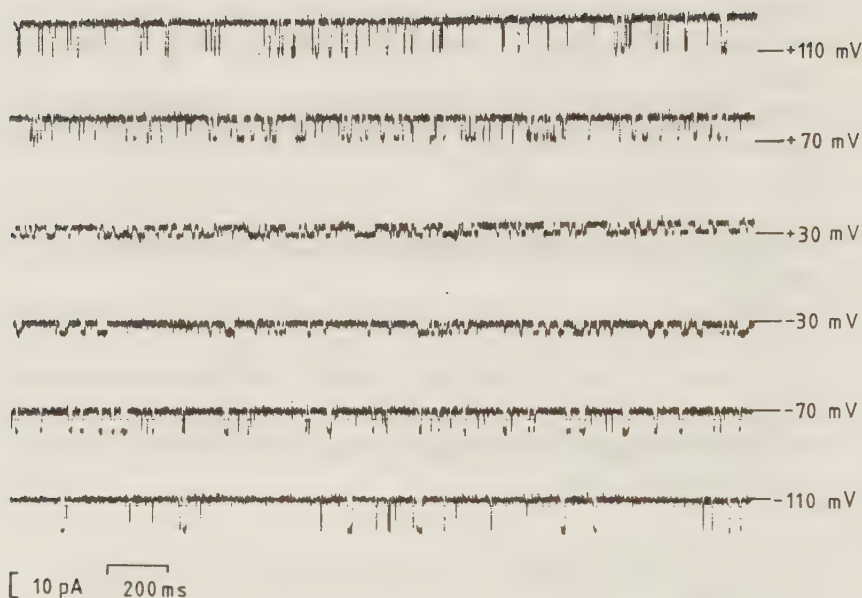


Abb. 1.3 Einzelkanalfluktuationen des Phalloporins in Abhängigkeit von der Membranspannung

Aus Wilmsen et al., 1985

Gezeigt sind die Stromfluktuationen einzelner Phalloporinkanäle bei positiven (Vorzeichen bezogen auf die Proteinzugabeseite) und negativen Membranspannungen. Der Balken an der rechten Seite der einzelnen Spuren markiert den geschlossenen Zustand des Kanals, d. h. Kanalöffnungen bei positiven Spannungen sind als Stromregistrierungen nach oben bzw. bei negativen Spannungen nach unten gerichtet. Die Wahrscheinlichkeit, den Kanal im offenen Zustand vorzufinden, ist hoch bei positiven und gering bei negativen Spannungen.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,3-SMPC, 1,2-DOPS, Cholesterol (7 : 2 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.0

Proteinkonzentration: 0.5 - 2.8 $\mu\text{g/ml}$

Temperatur: + 37°C

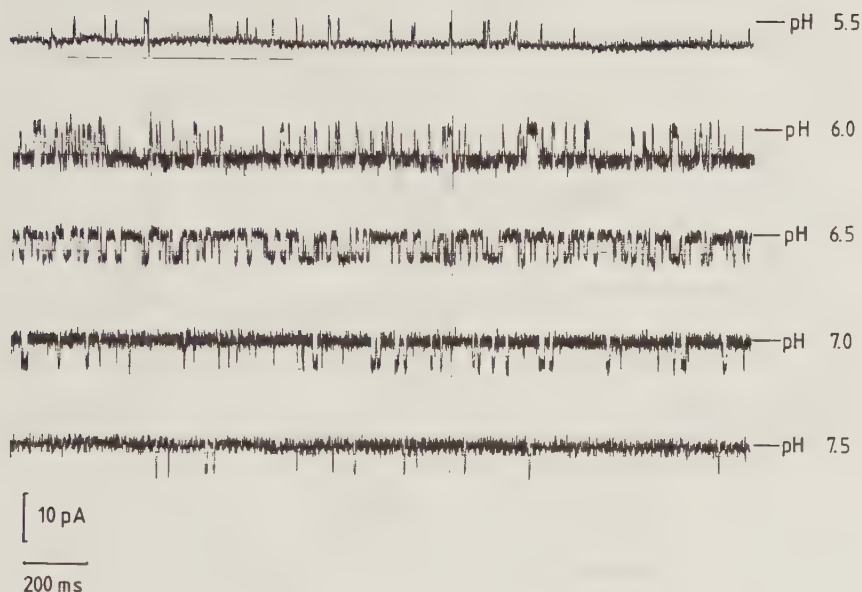


Abb. 1.4: Einzelkanalfuktuation des Phalloporins in Abhängigkeit vom pH-Wert
Aus Wilmsen et al., 1985

Gezeigt sind die Stromfluktuationen einzelner Phalloporinkanäle bei konstanter Membranspannung und variiertem pH-Wert. Der Balken markiert - wie in Abb. 1.3 - den geschlossenen Zustand des Kanals. Kanalöffnungsereignisse sind als Stromregistrierungen nach unten gezeigt. Der Kanal bleibt bei niedrigem pH-Wert mehr im offenen Zustand, bei neutralem bis basischem pH-Wert ist der Kanal vorwiegend im geschlossenen Zustand vorzufinden.

Membranspannungen: - 50 mV bei pH 5.5, 6.5 und 7.0

- 60 mV bei pH 6.0

- 52 mV bei pH 7.5

Experimentelle Bedingungen wie unter Abb. 1.3 beschrieben

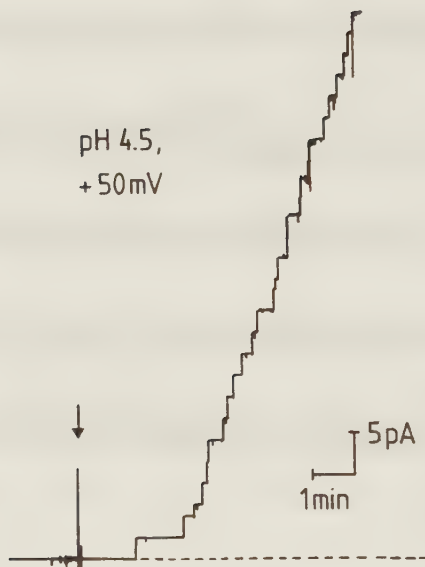


Abb. 1.5: pH-induzierte Inkorporation des Phalloporins

Nach Applikation des Phalloporins (Pfeil) zur cis-Seite der Membran kann bei einem niedrigen pH-Wert (pH 4.5) der Elektrolytlösung nach einer kurzen Verzögerungszeit der Einbau einzelner Kanäle in Form diskreter Stromstufen beobachtet werden. Die Stromamplituden (Einzelkanalleitwerte) bei einer angelegten Membranspannung von +50 mV sind einheitlich. Der Einzelkanalleitwert kann in 1 M NaCl-Lösung mit 52 pS angegeben werden.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2-POPC, Cholesterol (9 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Proteinkonzentration: 0.5 µg/ml

Membranspannung: +50 mV

Temperatur: +20°C

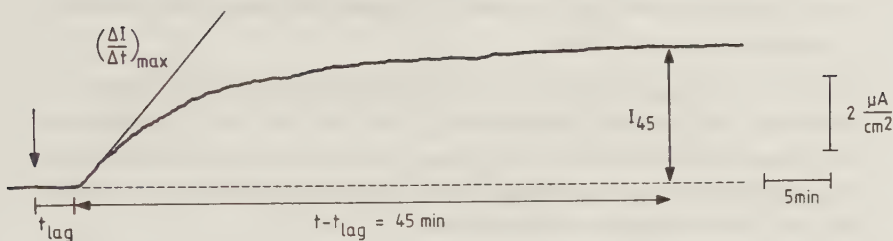


Abb. 1.6: Kurvenverlauf der Kanalinkorporation des Phalloporins

Aus Wilmsen, 1987

Nach Zugabe (Pfeil) des Phalloporins kommt es bei niedrigem pH-Wert nach kurzer Verzögerungszeit (t_{lag}) zu einem zunächst raschen Zuwachs des Membranstromes, der aber mit der Zeit langsamer wird und letztlich in eine stetige Drift übergeht. Bei der geringen Stromauflösung können keine Einzelkanalfuktuationen mehr festgestellt werden. Um das Kanaleinbauverhalten quantitativ beschreiben zu können, werden von Wilmsen (1987) drei Einbauparameter festgelegt: a) die Verzögerungszeit t_{lag} , b) die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{max}$, c) der Membranstrom I_{45} jeweils 45 Minuten nach Beginn des Leitfähigkeitzuwachses.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2-POPC, 1,2-DOPS, Cholesterol ($\Gamma : 2 : 1$)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Proteinkonzentration: 0.28 $\mu g/ml$

Membranspannung: +50 mV

Temperatur: +20°C

Um dieses Einbauverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert, der angelegten Membranspannung und der eingesetzten Proteinkonzentration quantifizieren zu können, wurden von Wilmsen (1987) die drei - in Abb. 1.6 veranschaulichten - Einbauparameter festgelegt:

- a) die Verzögerungszeit t_{lag} zwischen dem Moment der Zugabe und dem Auftreten des ersten Kanals
- b) die maximale Zuwachsrate des Membranstromes $(\Delta I / \Delta t)_{max}$
- c) der Membranstromwert I_{45} , der jeweils 45 Minuten nach Beginn des Leitfähigkeitszuwachses erreicht wird.

Bei der Entwicklung des in dieser Arbeit beschriebenen Kanaleinbautests wurde zur Bestimmung der spezifischen Kanaleinbaurrate (Kap. 2.2.1.1) nur der Einbauparameter der maximalen Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{max}$ zugrundegelegt. Anhand dieses Parameters soll hier deshalb die Abhängigkeit des Inkorporationsverhaltens vom pH-Wert und der Proteinkonzentration erläutert werden.

Aus den Einzelkanaldaten ist bekannt, daß bei positiven Membranspannungen und niedrigen pH-Werten die Phalloporinkanäle (N) vornehmlich im offenen leitenden Zustand sind. Unter Berücksichtigung des Einzelkanalstromes kann hieraus die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{max}$ bei konstanter Membranspannung auch als maximale Zuwachsrate an Phalloporinkanälen $(\Delta N / \Delta t)_{max}$ über die Beziehung:

$$\left(\frac{\Delta N}{\Delta t} \right)_{max} = \left(\frac{\Delta I}{I_K \Delta t} \right)_{max} \quad (1.1)$$

mit
$$I_K = \Lambda_K \cdot V \quad (1.2)$$

I_K = Einzelkanalstrom, Λ_K = Einzelkanalleitwert, V = Membranspannung

angegeben werden.

Dies ist in Abb. 1.7 bei der Darstellung der Kanaleinbauaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert der Fall. Der spontane Einbau von Phalloporinkanälen bei konstanter Membranspannung ist als maximale Einbaurrate $(\Delta N / \Delta t)_{max}$ gegen den variierten pH-Wert der Elektrolytlösung aufgetragen. Die maximale Einbaurrate kann - ausgehend von pH 6.4 - durch weiteres Absenken des pH-Wertes bis zu einem Sättigungswert bei pH 3 - 4 gesteigert werden.

Daß ein pH-abhängiger Membraneffekt (z.B. durch negativ geladene Lipide) das spontane Einbauverhalten durch pH-Erniedrigung steuert, scheint unwahrscheinlich, da auch in Bilayern mit ungeladenen Lipiden der pH-induzierte Einbau von Phalloporin beobachtet werden kann. Wilmsen (1987) erklärt den spontanen Einbau durch

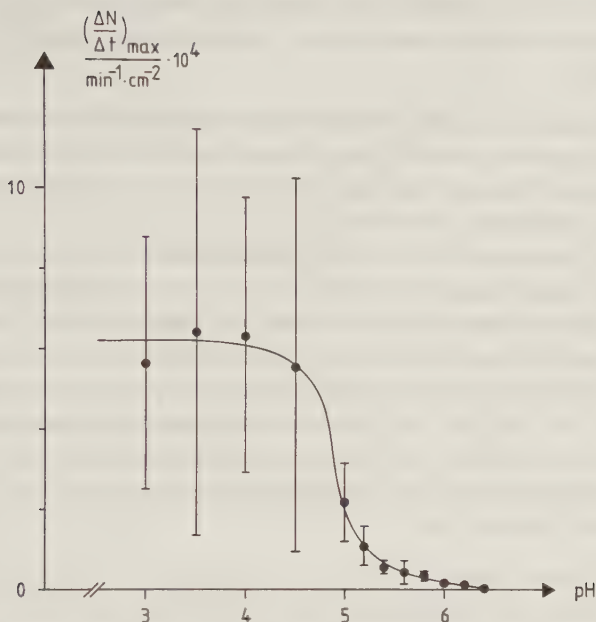


Abb. 1.7: Die maximale Einbaureate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert
Aus Wilmsen, 1987

Aus der maximalen Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$ läßt sich unter Berücksichtigung des Einzelkanalstromes I_K bei konstanter Spannung die maximale Zuwachsrate an Phalloporinkanälen $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ berechnen (Kapitel 1.3.2) und auf die Membranfläche normieren. Die maximale Einbaureate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ nimmt zu sauren pH-Werten hin S-förmig zu und erreicht bei pH 3 - 4 einen Sättigungswert.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2-POPC, 1,2-DOPS, Cholesterol (7 : 2 : 1)

Proteinkonzentration: 0.28 $\mu\text{g/ml}$

Membranspannung: +50 mV

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH-Wert variiert

eine pH-induzierte Neutralisation einer Ladung des Proteinmoleküls, die die Konformationsänderung von einer wasserlöslichen in eine hydrophobe Form des Kanal-moleküls begünstigt.

Die Untersuchungen zum Inkorporationsverhalten in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration führten zu dem Ergebnis, daß die Phalloporinkanäle einheitlich strukturierte Komplexe sein müssen, die nach ihrer Inkorporation vollkommen unabhängig voneinander funktionieren.

Die doppeltlogarithmische Auftragung des Einbauparameters $(\Delta N / \Delta t)_{\max}$ gegen die eingesetzte Phalloporinkonzentration (Abb. 1.8) bei konstanter Membranspannung und niedrigem pH-Wert liefert nach Wilmsen (1987) eine Gerade mit einer Steigung von 0.96. Die maximale Stromzuwachsrate bzw. Phalloporinzuwachsrate ist damit mit guter Näherung proportional zur Phalloporinkonzentration. Aufgrund des erhaltenen Exponenten von 0.96 läßt sich der konzentrationsabhängige Einbauprozess als Reaktion erster Ordnung beschreiben, d. h. der kanalbildende Proteinkomplex bildet sofort, ohne weiteren Aggregations- bzw. Oligomerisationsprozeß in der Membran, den transmembranären Ionenkanal aus.

Aus dem charakteristischen S-förmigen Kurvenverlauf der Kanalinkorporation und entsprechenden Perfusionsexperimenten mit kanaldotierten Lipidbilayern konnte ein insgesamt dreistufiges Inkorporationsschema für das Phalloporin aufgestellt werden. Zwischen dem Übergang von der wäßrigen Phase bis zur Ausbildung von Phalloporinkanälen wird ein zwischengeschalteter Zustand in Form einer Adsorption der Kanalstruktur an der Wasser-Lipid-Grenzfläche wie folgt postuliert (Wilmsen, 1987):



N_W = Anzahl der Phalloporinkanäle pro Volumeneinheit im Elektrolyten

N_A = Anzahl der adsorbierten Moleküle pro Flächeneinheit der Membran

N_K = Anzahl der Kanäle pro Flächeneinheit der Membran

1.4 Problemstellung

Der molekulare Wirkungsmechanismus des hämolytisch aktiven Phallolysins aus *Amanita phalloides* blieb bislang ungeklärt. Weder proteolytische noch lipolytische Enzymaktivitäten konnten in aufgereinigten Phallolysinproben nachgewiesen werden.

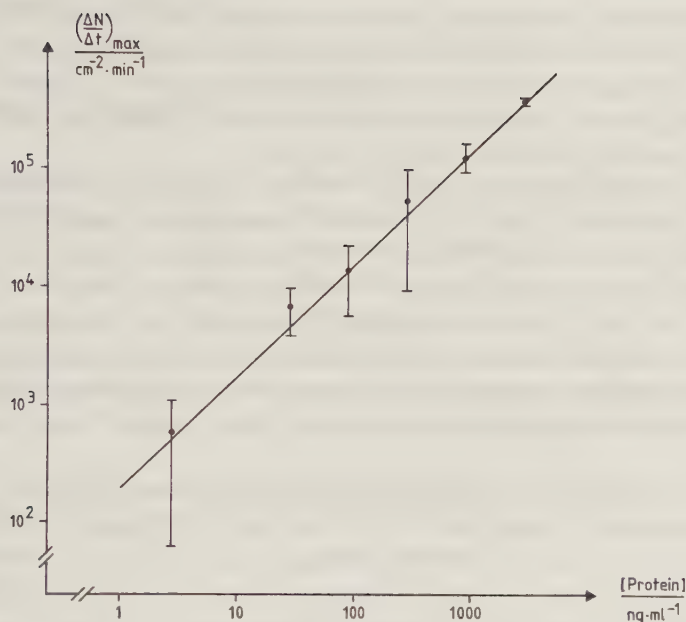


Abb. 1.8: Die maximale Einbaureate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration

Aus Wilmsen, 1987

Bei doppeltlogarithmischer Auftragung der maximalen Einbaureate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ gegen die Phalloporinkonzentration erhält man mit guter Näherung eine Gerade. Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0.96. Die maximale Einbaureate verhält sich somit direkt proportional zur eingesetzten Phalloporinkonzentration.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2-POPC, 1,2-DOPS, Cholesterol (7 : 2 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Membranspannung: +50 mV

Aufgrund kinetischer Messungen der Phallolysin-induzierten Hämolyse zeigten Seitz et al. (1981), daß der eigentlichen Lyse der Erythrozyten eine Membranpermeabilität für Kationen vorausgeht. Als molekularer Wirkungsmechanismus wurde daraufhin die osmotische Lyse durch Ausbildung kationenpermeabler Kanäle vorgeschlagen (Seitz et al., 1981, Faulstich et al., 1983 und Wilmsen et al., 1985).

Tatsächlich wurde in hämolytisch aktiven, wäßrigen Extrakten aus *A. phalloides* eine Substanz nachgewiesen, die sich in künstliche Lipidmembranen inkorporieren ließ und durch eine kanalbildende Wirkung die Membranleitfähigkeit besonders für monovalente Kationen um Größenordnungen erhöhen konnte (Wilmsen, 1983; Wilmsen et al., 1985). Da auch in ammoniumsulfatgefällten Proteinproben des *Amanita*-Extraktes mit hohem Anteil des wasserlöslichen Phallolysin der kationenpermeable Kanal vorzufinden war, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei der kanalbildenden und der hämolytisch aktiven Substanz um ein und dasselbe Protein handelte (Wilmsen et al., 1985).

Bei der Untersuchung einer hochaufgereinigten Phallolysinpräparation zeigte sich jedoch erstmalig die Diskrepanz, daß eine hohe Hämolyseaktivität in dieser Probe nicht gleichzeitig von einer hohen Kanaleinbaurate begleitet wurde (Kapitel 3.1).

Aufgrund des zu diesem Zeitpunkt nur möglichen, qualitativen Nachweises der Kanaleinbaurate durch das Auftreten einzelner Phalloporinkanäle in künstlichen Membranen, konnte der tatsächliche Gehalt der kanalbildenden Komponente am Gesamtprotein der aufgereinigten Probe nicht bestimmt werden. Die in dieser Dissertation zu bearbeitende Aufgabenstellung lag daher darin, einen quantitativen Test ähnlich einem Enzymaktivitätstest zu entwickeln, um über die Ermittlung der spezifischen Kanaleinbaurate einzelne Proben hinsichtlich ihrer hämolytisierenden und kanalbildenden Anteile untersuchen und miteinander vergleichen zu können.

Mit der Entwicklung des Kanalinkorporationstests sollte weiterhin die Möglichkeit geschaffen werden, die oben erwähnte Diskrepanz zwischen der hämolytischen und kanalbildenden Komponenten durch die Identifizierung und Charakterisierung des Kanalbildners aus *Amanita phalloides* aufzuklären.

2. Material und Methoden

Material- und Bezugsquellen:

Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Acrylamid, N, N'-Methylenbisacrylamid, SDS, Triton X-100, TMED, Serva Blue R, Bromphenol- blau, Rinderserumalbumin (BSA), Glycerin- aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPD), Cytochrom C
Sigma Chemie, Taufkirchen	DEAE-Sephadex A-25, Sephacryl S-300, Proteinase K aus Tritirachium album, Pronase E aus Streptomyces griseus, TRIZMA, Hepes
Baker Chemikalien, Groß-Gerau	Methanol, Äthanol, Essigsäure, Hexan, Ammoniumperoxidisulfat, NaCl, KCl
Riedel-De-Häen, Seelze	Ammoniumsulfat, Glycin
E. Merck, Darmstadt	β -Mercaptoäthanol, Glycerin, Folin-Ciocalteus- Reagenz
Behringwerke AG, Marburg	Sangocell-A ₂ : RH positiv, human, 5%-ige Erythrozyten-Suspension
Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm	Chloroform, Hexadekan, Cholesterin
Avanti, Birmingham, USA	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphocholin (1,2-POPC), Reinheitsgrad: 99%

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren vom Reinheitsgrad 'pro Analyse'. Cholesterin wurde von der Firma Fluka mit dem Reinheitsgrad: puriss. geliefert. Da Verunreinigungen durch Oxidationsprodukte vorlagen, wurde Cholesterin vor seiner Verwendung in Methanol/Diäthyläther = 1/1 (v/v) bei 4°C bis zu dreimal umkristallisiert und nachfolgend lyophilisiert.

2.1 Präparative Methoden

2.1.1 Gewinnung des Phalloporins und Phallolysins aus wäßrigen Extrakten von *Amanita phalloides*

Die Extraktionen erfolgten nach einer Methode von H. Faulstich (Laborprotokoll 1981). Tiefgefrorenes Pilzmaterial und ein Teil der V_1 - bzw. V_2 -Extrakte verschiedener Pilzchargen wurden durch Professor H. Faulstich aus Heidelberg überlassen. Die frischen Pilze der Gattung *Amanita* wurden in den Jahren 1984 - 1986 jeweils im August/September an unterschiedlichen Fundorten in der Umgebung von Heidelberg gesammelt. Die Pilze wurden sofort nach dem Einsammeln in Hut und Stiel zerlegt und portionsweise zu je 1.0 - 1.5 kg bei -20 bis -40°C in Plastikbeuteln eingefroren. Extrahiert wurden die einzelnen Chargen nach zwei aufeinanderfolgenden Verfahren:

V_1 : Ca. 0.7- 1.0 kg tiefgefrorenen Pilzmaterials werden über einen Gaze-Filter aufgetaut und die abtropfende Flüssigkeit in einem eisgekühlten Erlenmeyerkolben aufgefangen. Evtl. Trübungen durch Gewebe- bzw. Zellrückstände werden auf einer Sinterglasfritte abgenutscht. Der braune, wäßrige Extrakt dient als Ausgangsmaterial V_1 für die weiteren Untersuchungen. Aus einem Kilogramm Pilzen gewinnt man ca. 800 - 1 000 ml Extrakt.

V_2 : Das aufgetaute und abgetropfte Pilzmaterial wird in einem Waring-Mixer mit dem doppelten Volumen eisgekühlter 0.9%-iger (w/v) NaCl-Lösung insgesamt viermal für 20 Sekunden homogenisiert, um eine zu starke Erwärmung des Probenmaterials zu vermeiden. Das breiartige Homogenisat wird mit 0.9%-iger (w/v) NaCl-Lösung auf ein Endvolumen von 4 l gebracht und über Nacht auf einem Magnetrührer im Kühlraum gerührt. Das Homogenisat wird 45 Minuten bei 10 000 rpm in einem JA-10-Rotor zentrifugiert.

Der braune Überstand aus dem Zentrifugationsschritt wird über einer Sinterglasfritte abgenutscht und dient als Ausgangsmaterial V_2 (ca. 1200 - 1500 ml) für die weiteren Untersuchungen.

2.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Die wäßrigen Extrakte aus den Pilzaufarbeitungen werden mit 25%-iger Sättigungskonzentration (w/v) Ammoniumsulfat präzipitiert. Dazu werden im Eisbad unter ständigem Rühren die entsprechenden Mengen des Salzes langsam als Trockensubstanz

hinzugefügt. Der pH-Wert wird mit einer 25%-igen (v/v) NH_3 -Lösung auf 7.0 eingestellt und mit Hilfe von Indikatorpapier (Merck) ständig kontrolliert. Nach Zugabe des Ammoniumsulfats wird die Fällung im Kühlraum über Nacht unter langsamem Rühren fortgesetzt. Im Anschluß an die Fällung werden die Suspensionen für 45 Minuten bei 20000 rpm in einem SS-34-Rotor (50000 xg) in einer Hermle-Zentrifuge zentrifugiert, die Überstände abdekantiert und die Pellets in zwei Vol. 0.9%-iger (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen.

Die resuspendierten Proteinproben werden in einem Dialyseschlauch (Visking, Typ 36/32, Roth) gegen insgesamt 4 x 100 Vol. Aqua bidest. über Nacht dialysiert und anschließend lyophilisiert. Im lyophilisierten Zustand werden die Proteinproben in einem isolierten Exsikkator bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.3 Präparative Gelfiltration

Zur Auftrennung des ammoniumsulfatgefällten Proteinextraktes nach Molekülgröße wird das gesamte V_2 -Lyophilisat einer Pilzaufarbeitung über eine Sephacryl S-300-Säule (4.2 x 200 cm) gelfiltriert.

Die Lyophilisate werden in einem Puffer aus 0.5 M NaCl, 0.02% (w/v) Na-azid und 10 mM Tris/HCl pH 7.0 aufgenommen und auf die mit dem obengenannten Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen.

Die Elution wird im Kühlraum bei 4°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei einem Fraktionsvolumen von 12 ml/Fraktion durchgeführt. Die Extinktion des Eluates wird bei 280 nm mit Hilfe eines Durchflußphotometers (Uvicord, LKB) registriert und auf einem Schreiber (Uvicord, LKB) aufgezeichnet.

Die Fraktionen 40 - 54, 55 - 67, 68 - 75 und 76 - 92 werden zum FI-, FII-, FIII- bzw. FIV-Pool vereinigt, zwei Stunden gegen 10 Vol. Aqua dest. im Dialyseschlauch dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.1.4 Isolierung des Phalloporins durch differentielle Zentrifugation

Als Ausgangsmaterial zur differentiellen Zentrifugation dienen ca. 170 g tiefgefrorenen Pilzmaterials von *Amanita phalloides*. Die Pilze werden angetaut und in 2 Vol. Puffer aus 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, wie unter Kapitel 2.1.1 beschrieben, homogenisiert und anschließend auf 5 Vol. mit dem Puffer aufgefüllt.

Nach 20 Minuten Rühren bei 4°C wird das homogenisierte Gewebe in einem Elvehjem-Homogenisator (2 strokes) weiter aufgeschlossen. Die Zentrifugation des Homogenisats wird nach dem in Abb. 2.1 gezeigten Schema durchgeführt.

Die Pellets und die Überstände aus den einzelnen Zentrifugationsschritten werden anschließend auf ihre spezifischen Kanaleinbauten untersucht.

2.1.5 DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren

Alternativ zu einer Ionenaustauschchromatographie über eine Säule kann bei größeren Volumina eines Proteinrohextraktes das Batch-Verfahren mit Vorteil angewendet werden (Cooper, 1981).

Lösungen:	A	20 mM	NaCl
		5 mM	Tris/HCl, pH 7.4
B	100 mM	NaCl	
		5 mM	Tris/HCl, pH 7.4
C	200 mM	NaCl	
		5 mM	Tris/HCl, pH 7.4
D	400 mM	NaCl	
		5 mM	Tris/HCl, pH 7.4
E	800 mM	NaCl	
		5 mM	Tris/HCl, pH 7.4

Vorbereiten des Harzes: 0.3 g DEAE-Sephadex A-25 werden in 10 ml Lösung A resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absedimentieren des Harzes wird der Überstand mit den 'Fines' abdekantiert und das Harz erneut mit 10 ml Lösung A resuspendiert. Dieser Waschvorgang des Harzes wird zweimal wiederholt.

Bindung und Elution: 5 ml der gewaschenen Matrix werden in je 20 ml Proteinlösung (max. 200 mg Protein) resuspendiert und 20 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem Protein ein.

Nach der Inkubation läßt man das Harz für 10 Minuten absedimentieren, der Überstand mit dem ungebundenen Protein wird vorsichtig abdekantiert (DEAE-E-20). Das zurückbleibende Harz wird in 10 ml Lösung B resuspendiert, für 20 Minuten inkubiert

Schema zur differentiellen Zentrifugation

Homogenisat in 150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl pH 7.4

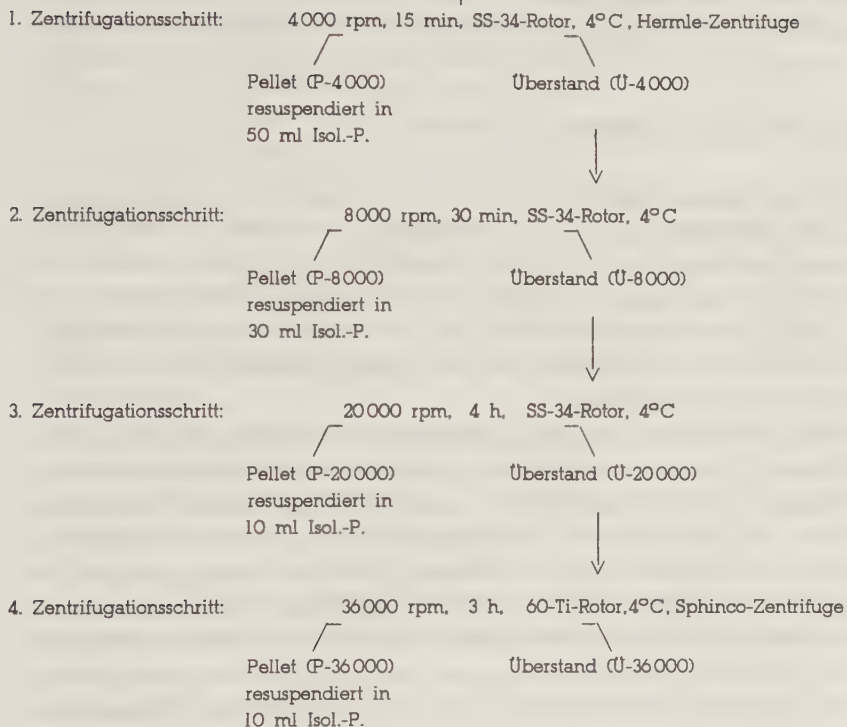


Abb. 21: Schema zur differentiellen Zentrifugation

Das Homogenisat aus 170 g tiefgefrorenem Pilzmaterial wird mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation in je 4 Pellet- und je 4 Überstandsproben fraktioniert. Anschließend werden die Probenvolumina und der Proteingehalt (nach Lowry) bestimmt. Als Isolationspuffer (Isol.-P.) dient der auch schon zur Homogenisation eingesetzte Puffer aus 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4.

und anschließend absedimentiert. Der Überstand (DEAE-E-100) wird erneut vorsichtig abgenommen.

Das Verfahren der Inkubation, Sedimentation und Dekantierung wird in gleicher Weise mit den Lösungen C, D und E durchgeführt. Auf diese Weise wird die Proteinlösung in fünf grobe Fraktionen aufgeteilt: DEAE-E-20, -E-100, -E-200, -E-400 und -E-800, die in Aliquoten auf Hämolyseaktivität und Kanaleinbaurate untersucht werden können.

2.1.6 Präparative Gelelektrophorese des FII-Pools

Für die präparative Gelelektrophorese wird ein 15%-iges (w/v) SDS-Gel, wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben, hergestellt. In Abwandlung zur Methode von Laemmli (1970) werden die Proben jedoch nicht im Probenpuffer auf 100°C erhitzt, sondern eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben bei 8 000 xg für vier Minuten zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Zur Elution der Proteinbanden aus dem Gel werden pro Geltasche mindestens 50 µg Protein der FII-Probe eingepipettiert.

Da der präparative Teil des Gels im Anschluß an die Trennung nicht gefärbt wird, dient ein Auftrag von 5 µg FII-Probe in eine Geltasche zur Markierung der Wanderungstrecken der Proteinbanden. Nach der Elektrophorese wird dieser Gelstreifen der Färb- bzw. Entfärbeprozedur unterzogen (Kapitel 2.2.5). Während dieses Färbvorgangs wird der präparative Teil des Gels bei -5°C fixiert.

Unter Berücksichtigung der Schrumpfung des gefärbten Gelstreifens lassen sich im ungefärbten Gel die Proteinbanden identifizieren und können großzügig ausgeschnitten werden.

Die zerkleinerten Gelstücke werden in einer Elektroelutionskammer (Biotrap, Schleicher & Schüll) im Elektrodenpuffer (Kapitel 2.2.5) mindestens acht Stunden bei 200 V eluiert und im Anschluß in der Biotrap-Anlage für mindestens fünfzehn Stunden gegen einen Puffer aus 50 mM Tris, 50 mM Borsaure pH 8.3 elektrodialysiert.

2.1.7 Methanol-Präzipitation von Phalloporin und Phallolysin

Aliquote des Überstandes (U-36000 rpm) aus der differentiellen Zentrifugation und den Poolfraktionen FII bzw. FIV aus der Sephacryl S-300-Säule (in 20 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl pH 7.4) werden durch Zugabe von je 1 Vol. eiskühler Methanolösung verschiedener Konzentrationen (absolut, 50%, 20%) im Eisbad gefällt.

Die Proben werden anschließend vier Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 8000 xg abzentrifugiert.

Die Überstände werden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und gegen 5 Vol. Puffer: 20 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl pH 7.4 mindestens zwei Stunden im Dialyseschlauch dialysiert. Nach ihrer Entnahme aus dem Dialyseschlauch werden die Volumina bestimmt.

Die aus der Zentrifugation resultierenden Sedimente werden in den den Überständen entsprechenden Volumina mit o. g. Puffer resuspendiert.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Messung der spezifischen Kanaleinbauräte

2.2.1.1 Grundlagen zur Methodik

a) Künstliche, planare Lipidmembranen nach der Mueller-Rudin- und der Montal-Mueller-Technik

Durch die von Mueller et al. (1962) entwickelte Methode zur Herstellung von künstlichen, planaren Lipidmembranen war erstmalig die Voraussetzung geschaffen, einzelne, rekonstituierte Transportsysteme unter gezielten, elektrochemischen Bedingungen im Modellsystem zu analysieren.

Das Herstellungsverfahren künstlicher Lipidmembranen nach der sog. Mueller-Rudin-Technik ist in Abb. 2.2 wiedergegeben.

Die Membran entsteht auf einer kreisrunden, im Durchmesser ca. 1 - 3 mm-Bohrung in der Trennwand einer zweikammerigen Teflonküvette, die beidseitig mit Elektrolytlösung gefüllt ist (Abb. 2.2 oben). Ein Tropfen einer Lipid/n-Dekan-Lösung wird mittels einer Teflonschleife auf die Bohrung gestrichen. Das Lösungsmittel diffundiert mit der Zeit aus dem Lipid/n-Dekan-Tropfen heraus, wobei schließlich spontan an einer Stelle ein Übergang zu einer Lipiddoppelschicht (black lipid membrane) stattfindet, die im Endstadium die Bohrung überspannt (Abb. 2.2 unten). Der Vorgang des 'Schwarzwerdens' der Membran bis zum Lipidbilayer kann durch ein Glasfenster in der Vorderkammer optisch kontrolliert werden.

Ein Nachteil dieser Methode ist der auch im Stadium der 'black lipid membrane' noch erhebliche Anteil an organischem Lösungsmittel, der bei einigen untersuchten Kanalproteinen zur Beeinträchtigung der Funktion bis hin zur Funktionsunfähigkeit führen kann (Hanke, 1984).

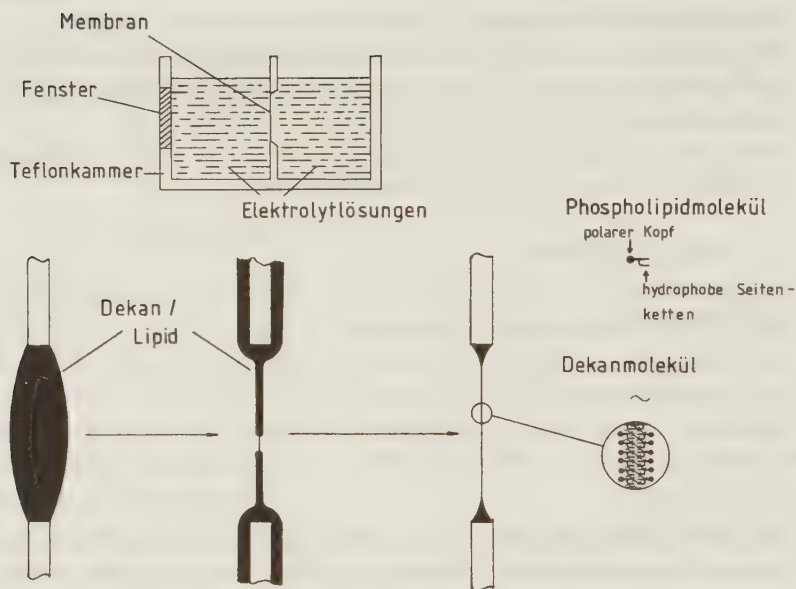


Abb. 22: Mueller-Rudin-Methode zur Herstellung von künstlichen, planaren Lipidmembranen

Nach Barnberg et al., 1974

Im oberen Bildteil ist die zweikammerige Teflonküvette, die beidseitig mit Elektrolytlösung gefüllt ist, dargestellt. Die künstliche Lipidmembran entsteht auf der kreisrunden Bohrung (ca. 1 - 3 mm) der mittleren Trennwand. Die Ausbildung der black-lipid-membrane kann über das Glasfenster in der Vorderkammer der Meßküvette optisch kontrolliert werden.

Im unteren Bildteil ist die mit Lipid behandelte Blendenöffnung vergrößert dargestellt. Durch Abdiffusion des Lösungsmittels (n-Dekan) dünnt sich der Lipidtropfen nach und nach aus und überspannt im Zustand der black-lipid-membrane als bimolekulare Lipidschicht die Blendenöffnung. Ein Nachteil der Methode besteht in dem noch erheblichen Anteil an Lösungsmittelmolekülen in der Membran.

Durch das von Montal und Mueller (1972) modifizierte Herstellungsverfahren künstlicher Lipidmembranen unter Verwendung eines leicht-flüchtigen Lösungsmittels (n-Hexan) gelang es dann, nahezu lösungsmittelfreie, planare Lipidbilayer zu erhalten.

Das Prinzip der Montal-Mueller-Technik ist in Abb. 2.3 dargestellt.

Die Kammern der Meßzelle sind mit Elektrolytlösungen zunächst derart gefüllt, daß die Oberflächen unterhalb der Öffnung in der Trennwand liegen. Je ein Tropfen einer Lipid/n-Hexan-Lösung werden auf diese Oberflächen gespreitet, so daß sich nach Verdunsten des Lösungsmittels aufgrund des amphipathischen Charakters der Phospholipidmoleküle eine Lipidmonoschicht an der Grenzfläche Elektrolyt - Luft ausbildet. Durch das Anheben des Lösungsspiegels einer Kammer über die Bohrung bildet sich ebenso auf der Trennwandöffnung eine Lipidmonoschicht aus. Die Lipidmoleküle sind wieder derart orientiert, daß die polaren Kopfgruppen in die Wasserphase und die apolaren Fettsäurereste in die zweite Kammerhälfte ragen.

Wird auch auf dieser Seite der Trennwand der Lösungsspiegel in gleicher Weise angehoben, bildet sich durch Aneinanderlagern der beiden Monolayer eine Lipiddoppelschicht aus.

Schindler und Feher (1976) gelang es, die Montal-Mueller-Methode durch Verwendung einer dreiteiligen Meßzelle, bestehend aus zwei einzelnen Teflonkammerhälften und einem dazwischenliegenden, dünnen Teflonseptum mit kleiner Blendenöffnung, zu verbessern.

Der mechanische Aufbau dieser Meßzelle und die Herstellung der Teflonsepten werden in Kapitel 2.2.1.2 detailliert beschrieben.

Ein entscheidender Vorteil der Septentechnik besteht darin, daß eine Blendenöffnung mit erheblich geringerem Durchmesser (0.1 - 0.5 mm) kontrolliert hergestellt werden kann. Auf diese Weise können Lipidmembranen mit sehr kleinen Flächen ($8 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$) gebildet werden, die aufgrund des reduzierten Membranrauschens meßtechnisch zu besseren Strom- bzw. Zeitaufösungen führen.

Mit der Weiterentwicklung der Septentechnik durch Hanke (1981) ist es derzeit möglich, Membranflächen von $300 \mu\text{m}^2$ und beachtlichen Stromauflösungen zu erreichen (Hanke und Boheim, 1980).

Die in dieser Arbeit verwendete Bilayer-Meßtechnik ist eine Kombination aus dem Verfahren zur Herstellung von künstlichen Lipidmembranen nach Montal und Mueller und der modifizierten Septen-Methodik nach Schindler und Feher.

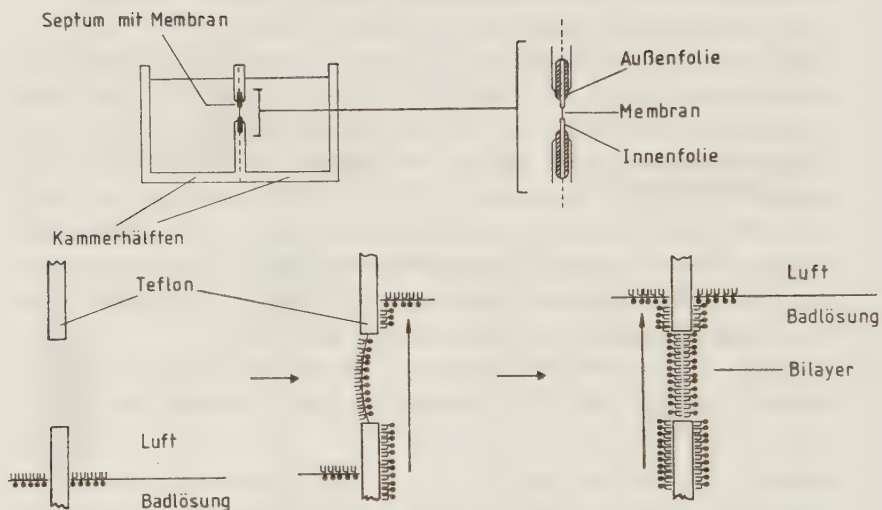


Abb. 2.3: Montal-Mueller-Methode zur Herstellung von nahezu lösungsmittelfreien Lipidmembranen

Die dreiteilige Meßzelle (oben) besteht aus zwei aneinandergesetzten Teflonkammern und einem dazwischenliegenden, dünnen Teflonseptum (s. Abb. 2.4). Auf den Oberflächen der Badlösungen werden je ein Tropfen einer Lipid/n-Hexan-Lösung gespreitet. Durch Verdunstung des leichtflüchtigen Lösungsmittels entstehen so in den Kammerhälften zwei Monolayer. Durch das beidseitige Anheben der Wasserspiegel über die Blendenöffnung werden die beiden Monolayer zu einem Bilayer zusammengelagert (unten). Der Vorteil der Montal-Mueller-Technik ist die Bildung nahezu lösungsmittelfreier Modellmembranen.

b) Spezifische Kanaleinbauraten

Die detaillierten Untersuchungen zum Inkorporationsverhalten des Phalloporinkanals an künstlichen Lipidmembranen waren für die Entwicklung eines quantitativen Kanalinkorporationstests grundlegend (Kapitel 1.3.2.2). Aus den Befunden zur pH- und Konzentrationsabhängigkeit der Kanalinkorporation erwies sich der Einbauparameter der maximalen Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$ als geeignet, um verschiedene Phalloporinpräparationen quantitativ miteinander vergleichen zu können.

Die maximale Kanaleinbauraten $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ - und unter Berücksichtigung der Gleichung 1.1 (Kapitel 1.3.2.2) auch die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$ - ist direkt proportional zur eingesetzten Proteinkonzentration.

Anders formuliert, kann man daraus ableiten, daß bei gleich hohen Proteinkonzentrationen und identischen experimentellen Bedingungen die maximale Stromzuwachsrate ein direkt zu vergleichendes Maß für den Anteil des kanalbildenden Proteins am gesamten, im Test eingesetzten Protein ist.

In Analogie zu einem spezifischen Enzymaktivitätstest zur Bestimmung der Reinheit einer Enzympräparation stellt die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge und die Membranfläche, ein Kriterium für die Reinheit einer Phalloporinpräparation hinsichtlich der kanalbildenden Komponente dar. Die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$ wird graphisch aus der maximalen Steigung einer im linearen Anfangsbereich der Kanaleinbaukurve angelegten Tangente ermittelt (Abb. 1.6).

Unter identischen Versuchsbedingungen (Membranspannung: +50 mV, Elektrolyt: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH-Wert: 4.5) wird sie - normiert auf die Membranfläche und Proteinkonzentration - als *spezifische Kanaleinbauraten* definiert. Die Einheit der spezifischen Kanaleinbauraten wird in $\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ angegeben.

Die Meßempfindlichkeit des Kanalinkorporationstests ist sehr hoch, da die Linearität der konzentrationsabhängigen Inkorporation unter den gewählten Versuchsbedingungen auch bei Proteinkonzentrationen zwischen 10 - 100 ng/ml gewährleistet ist.

2.2.1.2 Herstellung der Teflonsepten und mechanischer Aufbau

Die Teflonsepten werden nach der von Hanke (1981) modifizierten Methode hergestellt: Aus einer 6 μm dicken Teflonfolie (Firma M. Huth, Industrietechnik, Starnberg) werden kreisrunde Scheiben mit einem Durchmesser von 1.2 cm ausgestanzt. Aus einer dickeren (80 μm) glasfaserverstärkten Teflonfolie (Firma Breitenbach, Wuppertal) fertigt

man Ringe mit einem Außendurchmesser von 1.2 cm und einem Innendurchmesser von 0.5 cm an. Sie dienen später als mechanisch verstärkender Rahmen der dünneren Tefloninnenfolien.

Die einzelnen Folienteile werden in Chloroform : Methanol = 2 : 1 (v/v) gereinigt, nach dem Trocknen je zwei Ringe und eine Scheibe, wie in Abb. 2.4 dargestellt, zusammengelegt und in einem gehärteten, planen Stahlblock fest eingespannt. Dieser wird dann mit den Teflonfolien in einem 860°C heißen Keramikofen ca. 90 Sekunden erhitzt. Beim Überschreiten der Erweichungstemperatur von ca. 400°C werden die Teflonschichten angeschmolzen und durch den festen Druck des Stahlblocks elektrisch isolierend miteinander verbunden. Anschließend wird der Stahlblock in kaltem Aqua bidest. abgeschreckt, der Septenrohling läßt sich auf diese Weise leicht von der Oberfläche des Stahlblocks abnehmen.

In die dünne Innenfolie des Rohlings wird über eine 40 KV-Funkenstrecke die kreisrunde Blendenöffnung mittig durchgeschmolzen. Je nach Positionierung der Elektroden und Anzahl der eingesetzten Funken resultieren Blendenöffnungen zwischen 80 - 250 µm im Durchmesser.

In den hier gezeigten Experimenten wurden ausschließlich Septen von 160 - 200 µm (Membranflächen: $4 - 6.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$) verwendet. Im Lichtmikroskop werden die fertigen Septen auf Randunschärfen untersucht, da diese im späteren Experiment die Bilayerstabilität extrem beeinträchtigen können. Erfahrungsgemäß ist es anzuraten, die Septen vor dem eigentlichen Versuch nochmals mit Hexan zu reinigen und nach dem Trocknen mit einer Hexan/Hexadekan-Lösung = 30 : 1 (v/v) vorzubehandeln, um lichtmikroskopisch nicht detektierte Randunschärfen auszugleichen.

Das Kernstück des mechanischen Aufbaus ist die dreiteilige Meßzelle (Abb. 2.4), bestehend aus den beiden Teflonkammern mit konischen Bohrungen von je 0.5 cm im Durchmesser und dem dazwischenliegenden fertigen Septum.

Die Teflonküvetten werden vor jeder neuen Benutzung in einer Reinigungsprozedur mit Chloroform, Methanol und Chromschwefelsäure von Lipid- und Proteinresten befreit, mehrere Stunden unter fließendem Wasser gespült und in Aqua bidest. kurz aufgekocht. Die abgekühlten Kammerhälften werden auf den die Bohrungen tragenden Seiten dünn mit Silikonpaste (Baysilone, Bayer) bestrichen, um nach dem Zusammenbau der Meßzelle eine elektrische Isolierung zwischen den Kammerseiten zu gewährleisten. Das vorbehandelte Septum wird gemäß der Abb. 2.4 paßgenau zwischen die beschichteten Kammerflächen eingefügt und diese Anordnung in einem

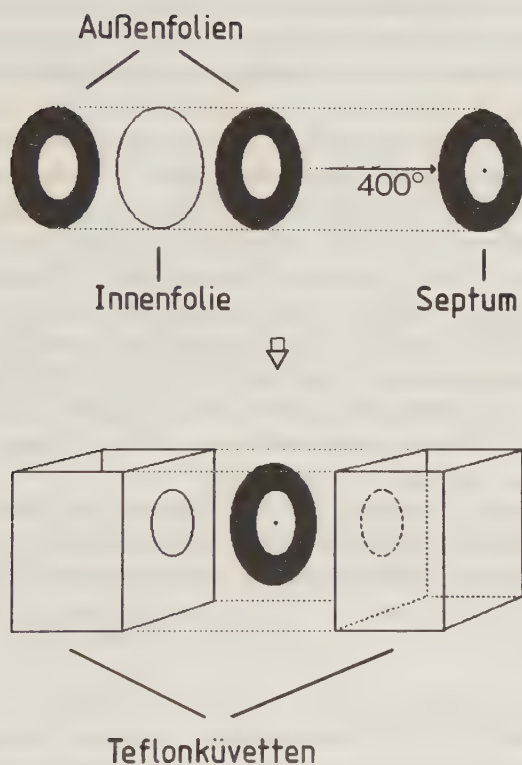


Abb. 24 Herstellung der Teflonsepten und Zusammenbau der dreiteiligen Meßzelle
 Das fertige Teflonseptum besteht aus einer runden Innenfolie und zwei ringförmigen, stabileren Außenfolien, die bei hohen Temperaturen durch Anschmelzen elektrisch isolierend miteinander verbunden werden (oben). Anschließend wird in die Innenfolie des Septenrohlings mittig eine ca. 80 - 250 μm große Blendenöffnung über eine Funkenstrecke eingeschmolzen. Das fertige Septum wird nach seiner Vorbehandlung mit einer Hexan/Hexadekan-Lösung zwischen die beiden Teflonküvettenhälften der Meßzelle eingebracht und in dieser Anordnung mit einem Stahlrahmen fest zusammengehalten.

Stahlrahmen zusammengepreßt, so daß an den Kontaktstellen der Kammerhälften keine Leckströme auftreten können.

In Abb. 2.5 ist der Gesamtaufbau der Meßanordnung skizziert. Der umstrichelte Bereich markiert die Elemente des Meßaufbaus, die zur Abschirmung gegen äußere, elektrische Störquellen (z. B. 50 Hz-Netzbrumm) in einem Faraday'schen Käfig untergebracht sind.

Die Kammerhälte (cis-Kompartiment), der die Proteinpräparationen zugegeben werden, ist mit einem über einen Elektromotor angetriebenen (hier nicht gezeigt) Magnetrührer (R) bestückt. Dadurch ist während der Messung eine gleichmäßige Durchmischung der Elektrolytlösung gewährleistet. Die cis-Seite der Meßzelle (4) ist über eine Ag-AgCl-Elektrode mit einem regulierbaren Spannungsgeber (2) verbunden. Die Größe der über die Membran anzulegende Kommandospannung kann mit Hilfe eines Spannungsmeßgerätes (3) kontrolliert werden. Bei Bedarf kann zusätzlich zum Spannungsgeber ein Funktionsgenerator (1), der kleine (0.1 - 0.2 mV) rechteckförmige Spannungsimpulse mit hoher Frequenz (50 - 100 Hz) liefert, zugeschaltet werden. Dies ermöglicht anhand der Größe des kapazitiven Umladestromes die Kapazität und damit indirekt die Dicke der Membran zu kontrollieren.

Die Membranströme werden über die Ag-AgCl-Elektrode der zweiten Kammerhälfte (trans-Kompartiment) in den Kopfverstärker (5) abgeleitet und als Spannungen auf dem nachgeschalteten Speicheroszillographen (6) sichtbar gemacht. An den Ausgangsverstärker des Oszillographen ist zur On-Line-Aufzeichnung ein XY-Schreiber (7) angeschlossen.

2.2.1.3 Elektronischer Aufbau

Bei Messungen von Membranströmen an künstlichen Lipidbilayern müssen aufgrund der zu erwartenden kleinen Stromamplituden hohe Anforderungen an die verwendete Meßelektronik gestellt werden.

Im Vielkanalexperiment, wie zur Bestimmung der spezifischen Kanaleinbauraten erforderlich, treten Stromflüsse in der Größenordnung zwischen 1 nA - 1 μ A auf. Bei qualitativem Nachweis der Kanaleinbaurate kann sogar nur mit Einzelkanalfluktuationen von wenigen Picoampere (10^{-12} A) Stromamplitude je nach Einzelkanalleitwert gerechnet werden.

Um den hohen Anforderungen an die Stromauflösung zu genügen, wurden im experimentellen Aufbau hochempfindliche Operationsverstärker verwendet, die nach dem

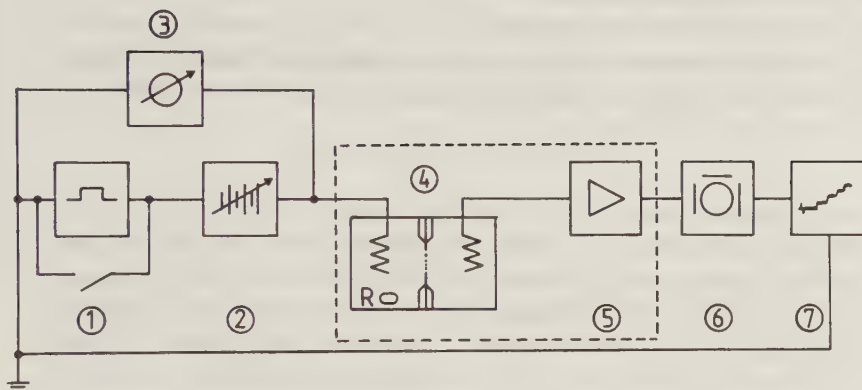


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der gesamten Meßanordnung

Der umstrichelte Bereich markiert die Elemente des Meßaufbaus, die zur Abschirmung gegen äußere elektrische Störquellen in einem Aluminiumgehäuse untergebracht sind.

(1) Funktionsgenerator

(2) Spannungsgeber } Eigenbau (Dr. W. Hanke)

(3) Spannungsmeßgerät

(4) Dreiteilige Meßzelle, über Ag-AgCl-Elektroden mit dem Spannungsgeber bzw. dem Strom-Spannungswandler verbunden. Der Magnetrührer (R) im cis-Kompartiment kann über einem Elektromotor (hier nicht gezeigt) unterhalb der Meßzelle angetrieben werden.

(5) Kopfverstärker

(6) Speicheroszillograph (Tektronix, 5103 N Oscilloscope)

(7) XY-Schreiber (Philips, PM 8141)

Prinzip eines Strom-Spannungswandlers funktionieren. Die prinzipielle Schaltung des elektronischen Meßkreises ist in Abb. 2.6 dargestellt. Der Schaltplan wurde von Dr. W. Hanke (Hanke, 1981) entworfen.

Bei einer vorgegebenen Membranspannung U wird der resultierende Membranstrom (I_m) auf den invertierenden Eingang des Operationsverstärkers (IC) geführt. Die durch den Strom-Spannungswandler erzielte Ausgangsspannung $-U_a$ ist durch die Beziehung:

$$-U_a = I_m \cdot R_f = \frac{U}{R_m} \cdot R_f \quad (2.1)$$

dem zu messenden Membranstrom proportional. Meßtechnisch bedeutet das, daß die Größe des Ausgangssignals und damit der Verstärkungsfaktor von der Wahl des Rückkopplungswiderstandes R_f abhängig ist. Da darüberhinaus bei den auftretenden Stromfluktuationen einzelner Membrankanäle neben den kleinen Stromamplituden auch noch mit schnellen Stromänderungen (im Bereich von ms) zu rechnen ist, sollte der Meßverstärker eine möglichst hohe zeitliche Auflösung gewährleisten. Die theoretische Frequenzbandbreite f_o eines Strom-Spannungswandlers wird begrenzt nach:

$$2\pi f_o = \frac{1}{R_f \cdot C_f} \quad (2.2)$$

Die parallel zum Rückkopplungswiderstand liegende Rückkopplungskapazität C_f wird in der Praxis noch aufgrund parasitärer Streukapazitäten vergrößert. Die Schaltung nach Abb. 2.6 ist deshalb in Anlehnung an Sigworth (1983) um den regelbaren Widerstand R_t und die Kapazität C_1 erweitert. Die gesamte Rückkopplungskapazität kann auf diese Weise auf den Wert der parasitären Streukapazitäten (ca. 0.5 pF) reduziert werden und die Grenzfrequenz des Meßverstärkers über den nach Gleichung (2.2) erreichbaren Wert angehoben werden. Bei den hier vorgestellten Versuchen ist mit einem Rückkopplungswiderstand von $8.5 \times 10^9 \Omega$ gearbeitet worden. Die Testanordnung ließ eine maximal erreichbare Bandbreite von ca. 10 kHz zu.

Durch eine Tiefpaß-Nachfilterung am Oszillographen wurde zugunsten einer höheren Stromauflösung die Frequenzbreite auf 1 kHz begrenzt. Das Stromrauschen des Verstärkers betrug so ca. 1.2 - 1.5 pA. Dieser für Vielkanalmessungen eigentlich sehr hohe Wert für R_f , ermöglichte eine hohe Stromauflösung, um auch bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen Einzelkanalfuktuationen messen zu können. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen (niedriger pH-Wert, positive Membranspannung) befindet sich der Phalloporinkanal vorwiegend im offenen Zustand (Wilmsen et al., 1985, Wilmsen, 1987), so daß mit einer erreichten Bandbreite von 1 kHz auch eine hinreichend gute Zeitauflösung erzielt wurde.

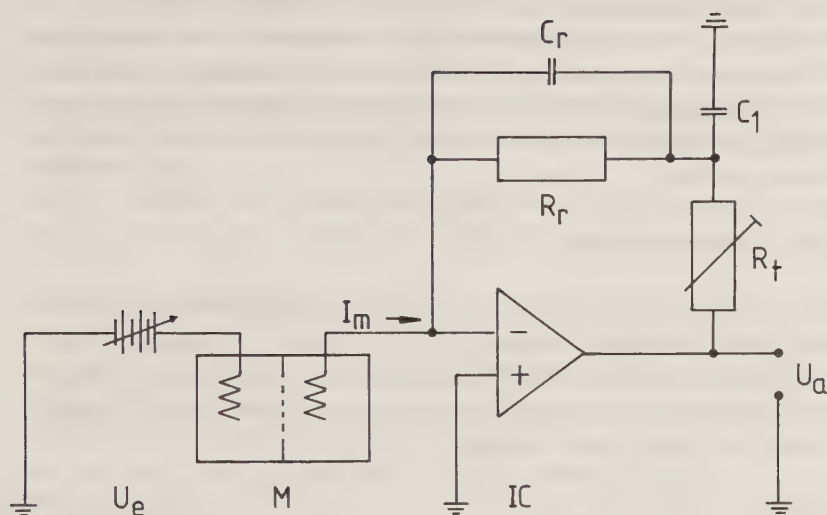


Abb. 26: Prinzipschaltbild des elektronischen Meßkreises

U_e = variable Membranspannung

M = Membran

I_m = Membranstrom

IC = Operationsverstärker: OPA 104 AM, Burr Brown

U_a = Ausgangsspannung des Verstärkers

R_r = Rückkopplungswiderstand: $8.5 \times 10^9 \Omega$

C_r = Rückkopplungskapazität: $\approx 0.5 \text{ pF}$

R_t = Trimpoti (Maximalwert $1 \text{ M}\Omega$)

C_1 = $0.47 \mu\text{F}$

Der Operationsverstärker wird über zwei 12 V-Autobatterien (hier nicht gezeigt) mit Strom versorgt, um Störeinstreuungen aus dem 50Hz-Stromnetz zu vermeiden.

Wie schon in Abb. 2.5 gezeigt, befinden sich der Meßverstärker, die Elektroden und die Meßzelle zur Abschirmung gegen äußere elektrische Störquellen in einem geerdeten Aluminiumgehäuse. Die zu Spannungen umgewandelten Membranströme werden auf einem Speicheroszillographen sichtbar gemacht und On-Line auf einem XY-Schreiber registriert.

2.2.1.4 Versuchsdurchführung

Für die Versuche mit künstlichen Bilayern werden Stammlösungen von den verwendeten Lipiden in Chloroform hergestellt: 1,2-POPC (25 mg/ml), Cholesterin (10 mg/ml). Unter Stickstoffatmosphäre bei -40°C gelagert bleiben die Stammlösungen mindestens eine Woche verwendbar. Mit Hilfe der Stammlösungen werden folgende Lipidmischungen zur Bilayerdarstellung angesetzt:

$$1,2\text{-POPC} : \text{Cholesterin} = 90 : 10 \text{ (mol\%)}$$

Dazu wird zunächst in einem Spitzkolben das Lösungsmittel unter Stickstoff-Begasung aus der Lipidmischung verflüchtigt. Da zur Ausbildung von elektrisch und mechanisch stabilen Lipidbilayern mit geringer Eigenleitfähigkeit das restlose Entfernen des Chloroforms unbedingt erforderlich ist, wird der zurückbleibende Lipidfilm mindestens für zwei Stunden lyophilisiert. Der getrocknete Lipidfilm wird in einer Konzentration von 4 mg/ml in Hexan : Äthanol = 10 : 1 (v/v) aufgenommen.

Das Meßsystem ist wie in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben aufgebaut. Die Kammern der Meßzelle enthalten je 3.7 ml der Meßlösung (1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat pH 4.5). Zur Darstellung eines Bilayers nach der Montal-Mueller-Methode (Kapitel 2.2.1.1) werden je 10 μl der obengenannten Lipidlösung auf die Oberflächen gespreitet. Die Ausbildung des Bilayers kann anhand der relativen Kapazitätsabschätzung (Kapitel 2.2.1.1) verfolgt werden. Die Zugabe der jeweils zu untersuchenden Präparation erfolgt in allen Experimenten asymmetrisch in die Elektrolytlösung der vorderen Kammer (cis-Kompartiment). Die Proteinendkonzentrationen bei Zugabe von 10 μl bis maximal 50 μl Proteinlösung variierten zwischen 0.27 μg und 5.4 $\mu\text{g/ml}$. Während des gesamten Versuchs sorgt ein im cis-Kompartiment befindlicher Magnetrührer für die gleichmäßige Durchmischung der Meßlösung.

Bei einer vorgegebenen Membranspannung von +50 mV (Vorzeichenkonvention, siehe Kapitel 2.2.1.5) kann nach ca. 1 - 4 Minuten ein stetiger Einbau einzelner Phalloporinkanäle in Form diskreter Stufen mit einem Leitwert von 52 pS unter den gegebenen experimentellen Bedingungen registriert werden.

Die maximale Steigung der Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{\max}$ wird anhand der Schreibernaufzeichnungen graphisch ermittelt (Abb. 1.6) und auf Proteinmenge und Membranfläche normiert.

Wenn im folgenden nicht besonders daraufhingewiesen wird, beziehen sich die spezifischen Kanaleinbauraten auf Mittelwerte zweier Messungen.

2.2.1.5 Vorzeichenkonvention

Bei allen Versuchen beziehen sich die Spannungsangaben bezüglich des Vorzeichens auf die Seite der Membran, die über die Ag-AgCl-Elektrode mit dem Spannungsgeber verbunden ist. Dieses Kompartiment wird als cis-Kompartiment bezeichnet, die Membranseite als cis-Seite. Die Proteinzugabe erfolgt jeweils zur cis-Seite.

Die Ag-AgCl-Elektrode der hinteren Kammer ist mit dem invertierenden Eingang des Operationsverstärkers verbunden und liegt auf virtuellem Erdpotential. Dieses Kompartiment wird als trans-Kompartiment bezeichnet, die entsprechende Membranseite als trans-Seite.

Ein positiver Strom entspricht einem Kationen-Transfer von der cis- zur trans-Seite und wird in den Schreiberregistrierungen als Ablenkung nach oben gezeigt.

2.2.2 Messung der Hämolyseaktivität

Die hämolytische Aktivität wurde nach einer Methode von Faulstich und Weckauf-Bloching (1974) bestimmt:

Zu je 0.5 ml einer 0.154 M NaCl-Lösung und 0.2 ml einer 5%-igen Erythrozyten-Suspension (Sangocell A₂, human erythrocytes) werden je 50 µl Aliquote einer Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Proteinprobe addiert und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zum Abstoppen der Reaktion je 2.5 ml der obengenannten NaCl-Lösung pro Testansatz dazupipettiert. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 1500 xg wird der Hämoglobingehalt in den Überständen bei 540 nm im Photometer (Perkin-Elmer) gemessen.

Als Kontrollwerte zur Bestimmung von 0 % bzw. 100 % Hämolyse der Erythrozyten-Suspension dienen Testansätze mit je 0.55 ml NaCl-Lösung und 0.2 ml Sangocell A₂ bzw. 0.55 ml Aqua bidest. und 0.2 ml Sangocell A₂.

Der Verdünnungsfaktor c der Proteinproben, bei dem 50%-ige Hämolyse auftritt, wird graphisch ermittelt (Abb. 3.6). Die hämolytische Aktivität einer Proteinlösung vom Volumen a wird definiert durch:

$$\text{H.E.} = \frac{a}{0.05 \cdot c} \quad (2.3)$$

Die spezifische Hämolyseaktivität wird in H.E./mg Protein angegeben.

2.2.3 Gelfiltration über Sephadex G-100

Ein Aliquot des ammoniumsulfatgefällten Proteinmaterials einer V_1 -Aufarbeitung wird im Elutionspuffer gelöst und über eine Sephadex G-100-Säule (1.25 x 82 cm) nach Molekülgrößen aufgetrennt.

Als Äquilibrations- und Elutionspuffer dient eine Lösung aus 0.5 M Tris/HCl pH 8.3, 0.02 % Na-azid und 1 mM PMSF.

Das Elutionsprofil wird bei 280 nm im Durchflußphotometer (Uvicord 8300, LKB) detektiert und auf einem Schreiber (Uvicord, LKB) aufgezeichnet. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 14 ml/h, das Fraktionsvolumen 1 ml.

Im Anschluß an die Trennung wird in jeder zweiten Fraktion über die Methode von Lowry et al. (1951) der Proteingehalt bestimmt.

Die Peakfraktionen P I, II und III werden gepoolt, über Carbowachs eingeeengt und einzeln, qualitativ auf Hämolyse bzw. Kanalaktivität hin untersucht.

2.2.4 Gelfiltration über Sephacryl S-300

Zur Bestimmung der relativen molekularen Masse wird ein Aliquot des ammoniumsulfatgefällten V_2 -Extraktes über eine kalibrierte Sephacryl S-300-Säule (2 x 80 cm) filtriert.

Die Säule ist mit einem Puffer aus 0.5 M NaCl und 10 mM Tris/HCl pH 7.0 äquilibriert. Die Elution wird bei 4°C und einer Fließgeschwindigkeit von 0.8 ml/min durchgeführt, es werden Fraktionen zu je 2.3 ml gesammelt.

Die Elutionspeaks werden über ihre Extinktion bei 280 nm in einem Durchflußphotometer bestimmt und ihr Elutionsvolumen ausgemessen. Jede zweite Fraktion wird über die Methode nach Lowry et al. (1951) auf ihren Proteingehalt untersucht.

Eine Kalibrierung der Säule wird mit Proteinen bekannter Molmassen durchgeführt (BSA, ADH, Apoferritin). Das Ausschlußvolumen und das Gesamtvolumen werden mit Dextranblau bzw. Hexacyanoferrat bestimmt. Die Ermittlung der apparenten molaren Massen der eluierten Proteinfractionen erfolgt durch die Bestimmung ihrer Verteilungskoeffizienten nach Siegel und Monty (1966) über die Beziehung:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) \quad (2.4)$$

K_{av} : Verteilungskoeffizient, V_e : Elutionsvolumen,

V_o : Ausschlußvolumen, V_t : Gesamtvolumen

2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die Proteine werden bei dieser Methode durch Na-dodecylsulfat (SDS) denaturiert, und es werden negative Ladungen in die zufallsgfalteten Polypeptidketten eingeführt (Shapiro et. al., 1967), wodurch die Eigenladungen des Proteins überdeckt werden. Im elektrischen Feld zeigen die behandelten Proteine eine lineare Abhängigkeit der Beweglichkeit vom Logarithmus ihrer relativen molaren Massen (Weber und Osborn, 1969). Die Trennung eines Proteingemisches erfolgt in diesem diskontinuierlichen Gelsystem nach Molmassen.

AA-Stammlösung	:	30% (w/v) Acrylamid
bis-AA-Stammlösung	:	1% (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer	:	1 M Tris/HCl pH 8.7
Sammelgelpuffer	:	0.25 M Tris/HCl pH 6.7
Elektrodenpuffer	:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS
Probenpuffer	:	80 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (w/v) Glycerin, 5% (w/v) β -Mercaptoäthanol, 2% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) Bromphenolblau
SDS-Stammlösung	:	20% (w/v) SDS
APS-Lösung	:	10% (w/v) Ammoniumpersulfat

Vorbereitung des Gels: Alle Angaben beziehen sich auf 150 x 170 mm große Flachgele mit einer Stärke von 1 mm, deren Trenngelkonzentration 15% Acrylamid beträgt. Die Spacer werden mit erhitzter 1%-iger (w/v) Agarlösung abgedichtet.

Für das Trenngel werden 15 ml AA-Lösung, 2,6 ml bis-AA-Lösung, 11,2 ml Trenngelpuffer, 0,15 ml SDS-Lösung, 30 µl TMED und 1 ml Aqua bidest. für 10 Minuten entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 0,15 ml APS-Lösung gestartet, die Trenngellösung eingefüllt und mit Aqua bidest. überschichtet. Nach Beendigung der Polymerisation wird das Aqua bidest. sorgfältig entfernt und das Sammelgel gegossen. Für ca. 10 ml Sammelgellösung werden 1,67 ml AA-Lösung, 1,3 ml bis-AA-Lösung, 5 ml Sammelgelpuffer, 0,05 ml SDS-Lösung und 10 µl TMED mit A. bidest. auf 10 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 50 µl APS-Lösung auf das Trenngel geschichtet.

Vorbereiten der Proben: Die Proben werden im Verhältnis 1 : 1 (v/v) mit dem Probenpuffer verdünnt, 2 Minuten bei 100°C erhitzt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 2 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände werden auf das Gel aufgetragen.

Als Markerproteine dienen Rinderserumalbumin (M_r 67k), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (M_r 36k) und Cytochrom C (M_r 12,4k).

Elektrophoresebedingungen: Die Elektrophorese wird mit einem konstanten Strom von 10 mA gestartet. Nach 10 Minuten wird die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Die Laufzeit des Gels beträgt ca. 3,5 Stunden.

Färben und Entfärben: Das Gel wird 20 Minuten unter ständiger Bewegung in einer Färbelösung aus 0,25% (w/v) Servablau R (vormals: Coomassie-Blau), 45,4% (v/v) Methanol, 9,2% (v/v) Essigsäure und 55% Aqua bidest. inkubiert.

Die Entfärbung erfolgt mit 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig und 65% Aqua bidest.

2.2.6 Native Gelelektrophorese nach Kühn et al. (1980)

Die native Gelelektrophorese wird in Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 durchgeführt. In geringen Konzentrationen eines nicht-ionischen Detergenz werden Membranproteine solubilisiert ohne denaturiert zu werden (Tanford und Reynolds, 1976). Die Trennung eines Proteingemisches erfolgt in einem Polyacrylamidgel unter nicht-dissoziierenden Bedingungen.

AA-Stammlösung /	50% (w/v) Acrylamid
bis-AA-Stammlösung :	1.35% (w/v) Bisacrylamid
Gelpuffer :	3 M Tris/HCl pH 9.2
Elektrodenpuffer :	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% Triton X-100
Probenpuffer :	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.5% (w/v) Triton X-100, 26% (w/v) Saccharose, 0.2% (w/v) Bromphenolblau
Saccharoselösung :	60% (w/v) Saccharose
APS-Lösung :	40% (w/v) Ammoniumpersulfat

Vorbereitung des Gels: Alle Angaben beziehen sich auf 150 x 170 mm Flachgele mit einer Stärke von 0.75 mm. Für 20 ml des 5%-Gels werden 2 ml AA/bis-AA-Lösung, 2.5 ml Gelpuffer, 0.1 ml Triton X-100-Lösung und 0.75 ml der Saccharoselösung mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Für das 25%-Gel werden 10 ml der AA/bis-AA-Lösung, 2.5 ml Gelpuffer, 0.1 ml Triton X-100-Lösung und 3.5 ml Saccharoselösung mit Aqua bidest. auf 20 ml ergänzt. Vor dem Gießvorgang werden die Gellösungen mindestens 10 Minuten entgast.

Nach Zugabe von 8 μ l TMED und 20 μ l APS-Lösung in das 5%-Gel bzw. 5 μ l TMED und 8 μ l APS-Lösung in das 25%-Gel wird der Gradient mit Hilfe eines Gradientenformers und einer Schlauchpumpe von unten gegossen.

Nach Beenden des Gießvorgangs wird das Gradientengel mit 60%-iger Saccharoselösung unterschichtet und nach dem Einstecken des Kammes zum Auspolymerisieren für mindestens zwei Stunden bei 50°C in den Trockenschrank gestellt.

Vorbereiten der Proben: Die Proben werden im Verhältnis 1 : 1 mit dem Probenpuffer verdünnt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als Markerproteine dienen ein Proteingemisch aus Thyroglobulin (M_r 660k), Apoferritin (M_r 440k), Katalase (M_r 232k), Lactat-Dehydrogenase (M_r 140k) und Rinderserumalbumin (M_r 67k).

Elektrophoresebedingungen: Die Elektrophorese wird im Kühlraum mit einem konstanten Strom von 8 mA gestartet. Nach 30 Minuten wird auf 15 mA erhöht. Die Laufzeit des Gels beträgt ca. 12 Stunden.

Färben und Entfärben: Das native Gel wird unter ständigem Schütteln 30 Minuten in einer speziellen Färbelösung aus 0.05% (w/v) G-250 Serva Blau in 3.5% (w/v) Perchlorsäure inkubiert.

Zum Entfärben wird das Gel für 15 Minuten in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 40% Aqua. bidest. gewaschen und anschließend in Aqua bidest. entfärbt.

2.2.7 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei diesem Gelsystem werden die Methoden von Kühn et al. (1980) für die erste und von Laemmli (1970) für die zweite Dimension kombiniert. Dadurch können die dissoziierbaren Untereinheiten des nativen Proteinmoleküls identifiziert und der Reinheitsgrad der Proteinprobe überprüft werden.

In der ersten Dimension wird eine native Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Nach Beendigung der Trennung und anschließender Färb- und Entfärbeprozedur werden die Proteinbanden einzeln ausgeschnitten und in die Geltaschen eines polymerisierten 15% SDS-Gels (Kapitel 2.2.5) übertragen.

Im Falle einer Verschmierung der Proteinbanden wird die gesamte Gelspur aus der nativen Gelelektrophorese auf die Oberkante eines 15% SDS-Gels aufgelegt. Zum Fixieren werden die Gelstücke bzw -streifen mit einer erhitzten 1%-igen (w/v) Agarlösung überschichtet.

Die Gelelektrophorese der zweiten Dimension wird wie in Kapitel 2.2.5 durchgeführt; die Stromzufuhr wird jedoch erst nach dem Einwandern der Proben in das SDS-Gel auf 30 mA erhöht.

Das Anfärben der Banden erfolgt mit der in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Coomassie-Färbung.

2.2.8 Proteinbestimmungen

a) nach Lowry et al. (1951)

Das Prinzip der Messung beruht auf der Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes in alkalischer Lösung. Dieser Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz), wobei ein intensiv blauer Farbstoff entsteht, der photometrisch gemessen werden kann.

Lösung A	:	2% (w/v) Na_2CO_3 , H_2O -frei in 0.1 N NaOH
Lösung B ₁	:	2% (w/v) Kaliumtartrat
B ₂	:	1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Lösung C	:	Lösung B ₁ und B ₂ 1 : 1 (v/v) gemischt, dazu wird das 49-fache Volumen Lösung A addiert. Die Lösung C wird vor jedem Gebrauch frisch aus den Stammlösungen hergestellt.
Lösung D	:	Folin-Ciocalteus-Reagenz

Die Aliquote der Proteinlösungen werden mit A.bidest. auf ein Volumen von 0.5 ml aufgefüllt und mit je 0.5 ml 15%-iger (w/v) Trichloressigsäure 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach dem Abzentrifugieren für vier Minuten bei 8000 xg werden die Sedimente in je 0.5 -ml 0.1 N NaOH vollständig resuspendiert. In 15 Sekunden-Schritten werden pro Aliquot jeweils 1 ml Lösung C hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Nach genau 10 Minuten werden 0.1 ml Lösung D addiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur kann die Absorption der Proben bei 740 nm bestimmt werden.

Als Proteinstandard werden 10 - 100 μg /0.5 ml Probe kristallines Rinderserumalbumin eingesetzt.

b) nach Markwell et al. (1978)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gegenwart von Detergenzien erfolgt in Anlehnung an die Methode von Markwell et al. (1978), da die Proteinbestimmung nach Lowry in Anwesenheit von SDS und Triton X-100 unzureichend ist.

Lösung A	:	2% (w/v) Na_2CO_3 , 1% (w/v) SDS, 0.4% (w/v) NaOH, 0.16% (w/v) Na-tartrat
Lösung B	:	4% (w/v) CuSO_4
Lösung C	:	100 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B (täglich frisch ansetzen)
Lösung D	:	1 Teil Folin-Ciocalteus-Reagenz und 1 Teil Aqua bidest. (täglich frisch ansetzen)

Je 0.3 ml der proteinhaltigen Aliquote werden mit 1 ml der Lösung C gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit je 0.1 ml Lösung D gemischt. Nach 45 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur kann die Absorption der Proben bei 660 nm gemessen werden.

Als Referenzprotein wird kristallines Rinderserumalbumin zwischen 1 - 60 µg/ 0.3 ml Probe eingesetzt.

2.2.9 Proteasebehandlung von Phalloporin und Phallolysin

Aliquote der Poolfraktionen FII und FIV aus der Sephacryl S-300-Säulenchromatographie werden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den unspezifischen Proteasen Proteinase K (aus Pilzen) und Pronase E (bakteriell) untersucht.

Hierzu werden je 50 µg FII bzw. FIV mit je 180 mU Proteinase K und je 90 mU Pronase E in einem Puffer aus 20 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.8 für 24 und 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Bestimmungen der Kanaleinbaurate und Hämolyseaktivität nach Proteaseabbauung werden die Proben 1 : 10 mit dem obengenannten Puffer verdünnt und bis zum Testansatz im Eisbad aufbewahrt.

2.2.10 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung der FII- bzw. FIV-Poolfraktion aus der Sephacryl-S-300-Chromatographie erfolgte auf kommerziellen Ampholyt-Flachfolien (Servalyt Precotes, Einführungskit) mit einem pH-Gradienten von 3 - 10.

Maximal 2 µg Protein pro Probe (in 10 mM Tris/HCl pH 7.4) und je 5 - 10 µl der Protein-Testmischung (Serva, Protein-Testmischung Nr. 9) werden dazu auf das Flachgel appliziert und unter Kühlung (4°C) nach folgendem Programm in einer Flachbett-Elektrophoresekammer (LKB, Horizontal-Elektrophorese) fokussiert: Mit 200 V beginnend, wird die Spannung schrittweise alle 20 Minuten auf 300, 600 und 1000 V erhöht. Nach Erreichen der Endstufe beträgt die Gesamtdauer der Elektrophorese ca. 5 Stunden.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Folien mindestens 10 Minuten in Fixiersäure (200 g TCA / 1 l Aqua bidest.) fixiert und anschließend 5 Minuten in einer Färbelösung (100 mg Serva Blau W / 250 ml Aqua bidest. / 5 ml Fixiersäure) angefärbt.

Zur Entfärbung werden die Folien ca. 5 Minuten in Entfärberlösung (10 ml Fixiersäure/1 l Aqua bidest.) inkubiert, kurz mit Leitungswasser abgespült und zum Neutralisieren in einer Lösung aus 0.2 ml TMED/1 l Aqua bidest. gespült, bis die Proteinbanden blau erscheinen. Die fertigen Precotes können bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Erste Hinweise auf die Nicht-Identität von Phalloporin und Phallolysin

Nachdem qualitativ in ammoniumsulfatgefällten Proteinpräparationen aus *Amanita phalloides* neben einer hämolytischen Substanz ebenfalls eine kanalbildende Komponente nachgewiesen werden konnte (Wilmsen et al., 1985), wurden auch höher aufgereinigte Phallolysinpräparationen hinsichtlich ihrer Kanalaktivität untersucht.

Der ammoniumsulfatgefällte Extrakt einer *Amanita*-Aufarbeitung wurde von H. Faulstich über eine Biogel P-30-Säule (Trennbereich M_r 20k - 50k) gelfiltriert, die hämolytisch aktivsten Fraktionen vereinigt und erneut - diesmal über eine Sephacryl S-300-Säule (Trennbereich M_r 10k - 1000k) - nach Molekülgröße getrennt. Aliquote des Fraktionspools höchster Hämolyseaktivität wurden an künstlichen Bilayern ausgetestet. Obwohl in der SDS-Gelelektrophorese die für die Hämolyseaktivität verantwortliche 34k-Proteinbande des Phallolysins (Faulstich et al., 1983) eindeutig zu identifizieren war (Abb. 3.1), konnte weder im Vielkanal- noch im Einzelkanalexperiment Kanalaktivität in dieser Probe nachgewiesen werden.

Daraufhin wurde in unserem Labor die ammoniumsulfatgefällte Proteinprobe einer Pilzaufarbeitung über Gelfiltration aufgetrennt, und die gepoolten Peakfraktionen einzeln auf Hämolyse und Kanalaktivität untersucht.

3.1.1 Gelfiltration über Sephadex G-100

In Abb. 3.2 ist das Elutionsprofil der Gelfiltration über die Sephadex G-100-Säule wiedergegeben. Die ammoniumsulfatgefällte Proteinprobe läßt sich über die Chromatographie auf drei Proteinpeaks (PI, PII, PIII) verteilen.

Da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen die Charakterisierung der kanalbildenden Substanz Phalloporin noch nicht so weit fortgeschritten war, um eine Analyse der spezifischen Kanaleinbauten zu erlauben, werden in der Tabelle 3.1 die Verteilungen der Aktivitäten in den verschiedenen Fraktionen rein qualitativ verglichen.

Tabelle 3.1

Fraktionspool	Hämolyseaktivität	Kanalaktivität	Proteinausbeute (%)
Peak I	+/-	+ +	25.4
Peak II	+ +	+/-	60.7
Peak III	+	-	6.1



Abb. 3J: Vergleich der ammoniumsulfatgefällten und der teilweise aufgereinigten Phallolysinproben nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese (nach Laemmli)

Aliquote eines ammoniumsulfatgefällten Extraktes aus *Amanita phalloides* (a, b) und über Gelfiltration aufgereinigte Phallolysinpräparationen (c, d) wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Gelelektrophorese wurde nach Kapitel 2.2.5 mit zwei Modifizierungen durchgeführt: Anstelle des 15%-igen Trenngels handelt es sich hier um ein 10%-iges Gel; die Proben wurden mit Probenpuffer unterschiedlicher SDS- Konzentrationen 1 : 1 verdünnt.

- (a) 8 µg ammoniumsulfatgefällter Extrakt, 0.1% SDS-Endkonzentration
- (b) 8 µg ammoniumsulfatgefällter Extrakt, 1 % SDS-Endkonzentration
- (c) 8 µg aufgereinigte Phallolysinpräparation, 0.1% SDS-Endkonzentration
- (d) 8 µg aufgereinigte Phallolysinpräparation, 1% SDS-Endkonzentration

Die aufgetragenen Proteinmengen wurden nach der Methode von Lowry et al. (Kapitel 2.2.8) bestimmt. Als Markerproteine dienten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPD) und Rinderserumalbumin (BSA).

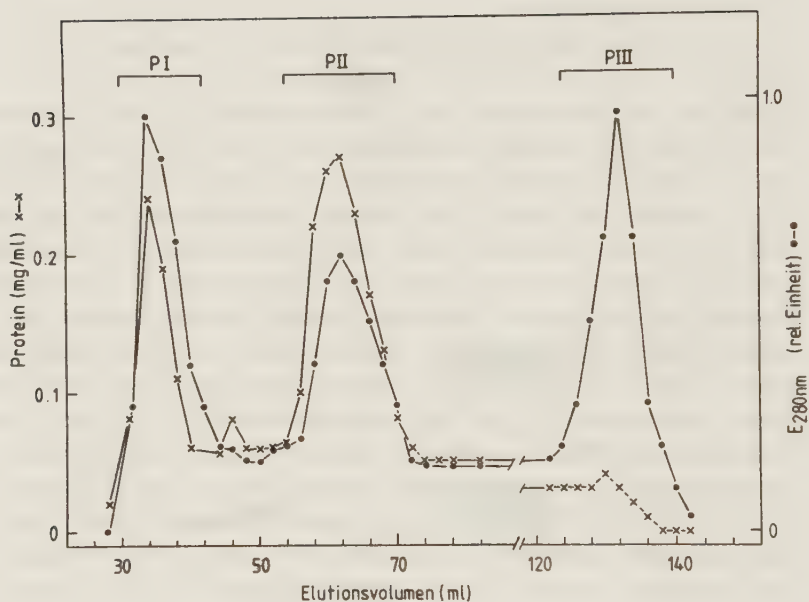


Abb. 32 Geelfiltration des ammoniumsulfatgefällten Proteinextraktes über Sephadex G-100

Ein Aliquot des ammoniumsulfatgefällten Extraktes aus *Amanita phalloides* wurde über eine Sephadex G-100-Säule gefiltriert und das Elutionsprofil bei 280 nm im Photometer registriert. In jeder zweiten Fraktion wurde anschließend der Proteingehalt nach Lowry et al. bestimmt. Die Klammern im oberen Bildteil markieren die zu den Fraktionspools PI, PII und PIII vereinigten Peakfraktionen.

Eine bei der Identität der kanalbildenden und hämolysierenden Substanz zu erwartende gleiche Verteilung der Aktivitäten in den Peakfraktionen, kann hier nicht festgestellt werden. Die kanalbildende Aktivität ist hauptsächlich in Peak I wiederzufinden, der ca. 1/4 der aufgetragenen ammoniumsulfatgefällten Proteinmenge darstellt, während die hämolytische Aktivität im P II-Fraktionspool anzutreffen ist.

Bei einem ermittelten Ausschlußvolumen der Säule von 42 ml liegt der Peak I außerhalb des Trennbereichs der Sephadex G-100-Säule (M_r 4k - 150k).

Das heißt, es können unter den gegebenen Bedingungen Molekül- bzw. Aggregatgrößen der kanalbildenden Substanz mit Molmassen ≥ 150 kD angenommen werden. Bei der von Faulstich durchgeführten Phallolysin-Aufreinigung wurde mit großer Wahrscheinlichkeit schon bei der ersten Gelfiltration über die Biogel P-30-Säule der größte Teil der kanalbildenden Proteinkomponente im Ausschlußvolumen eluiert und verworfen. In den weiteraufgereinigten Präparationen konnte aus diesem Grund keine kanalbildende Substanz identifiziert werden.

Unklar blieb bislang noch, ob es sich bei den beiden Komponenten um zwei unterschiedliche Proteine oder um zwei unterschiedliche Zustandsformen (z. B. Aggregat, Konformation) eines Proteins handelte. Vorausgesetzt, die Kanalbildung und die Hämolysen sind auf die Wirkung zweier unterschiedlicher Proteine zurückzuführen, mußten die für das hämolysierende Phallolysin gewählten Aufreinigungsmethoden nicht unbedingt effektiv sein zur Isolierung der kanalbildenden Substanz Phalloporin. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Präparationsmöglichkeiten zur Isolierung des Kanalbildners im Vergleich zur Isolierung des Phallolysin getestet. Durch die detaillierten Untersuchungen zum Inkorporationsverhalten des Kanalbildners in künstliche Lipidmembranen (Wilmsen 1987) war es nun darüber hinaus möglich, ein Testverfahren für die quantitative Bestimmung der Kanaleinbaurate einer Proteinprobe anzuwenden (Kap. 2.2.1.1).

3.2 Präparative Methoden zur Isolierung und Aufreinigung des Phalloporins

3.2.1 Extraktion von Phallolysin und Phalloporin aus *Amanita phalloides*

Wäßrige Extrakte von acht Pilzchargen (A - H) unterschiedlicher Fundorte wurden nach den im Kap. 2.1.1 beschriebenen Extraktionsverfahren von Faulstich (Laborprotokoll, 1981) extrahiert und von mir hinsichtlich ihrer hämolytischen und kanalbildenden Aktivitäten untersucht. Jede Charge bestand aus ca. 0.7 - 1.0 kg verschieden

weit entwickelter Fruchtkörper des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), die vor der Extraktion als tiefgefrorenes Pilzmaterial vorlagen.

Die Verteilung der spezifischen Hämolyseaktivitäten und Kanaleinbauraten in Abhängigkeit vom Fundort und Extraktionsverfahren ist in Abb. 3.3 dargestellt. In jeder Charge kann im entsprechenden Meßverfahren sowohl hämolytische (Kap. 2.2.2) als auch kanalbildende (Kap. 2.2.1) Aktivität nachgewiesen werden. Die spezifischen Hämolyseaktivitäten variierten zwischen 334 - 6070 H.E./mg bzw. im Falle der spezifischen Kanaleinbauraten zwischen 0.04 - 9.43 $\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$. Auffällig ist die mit Ausnahme von FV_1 recht geringe Variationsbreite in den spezifischen Hämolyseaktivitäten, unabhängig von Fundort und Extraktionsverfahren.

Im Gegensatz dazu ist die Streuung der spezifischen Kanaleinbauraten, insbesondere in Bezug auf die V_2 -Extraktion, relativ groß. Für die Hämolyse läßt sich eine mittlere spezifische Aktivität von 1667 H.E./mg für das V_1 -Verfahren und von 595 H.E./mg für das V_2 -Verfahren errechnen.

Die mittlere spezifische Kanaleinbaurate der verschiedenen Chargen beträgt für die V_1 -Extrakte 0.22 $\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ und für die V_2 -Extrakte 2.61 $\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$. Während Kanaleinbaurate und Hämolyseaktivität in den Pilzmaterialien hinsichtlich ihrer gemeinsamen Fundorte nicht miteinander in Beziehung gebracht werden können, existiert mit Ausnahme von Charge A eine nahezu reziproke Abhängigkeit der spezifischen Hämolyseaktivität bzw. Kanaleinbaurate bezüglich der Extraktionsverfahren. Die V_1 -Extraktion führt in nahezu allen Fällen zu höheren hämolytischen Aktivitäten, die V_2 -Extraktion hat eine größere Ausbeute der kanalbildenden Aktivität zur Folge. Die Proteinausbeute liegt bei der V_1 -Extraktion im Mittel mit ca. 1.5 g Protein/l kg tiefgefrorener Pilze um ca. 1.5-fach höher, als bei der V_2 -Extraktion.

3.2.2 Ammoniumsulfatfällung

Im Anschluß an die Extraktion nach dem V_2 -Verfahren wurden die Proteinextrakte einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Bei einer 25%-igen (w/v) Sättigungskonzentration Ammoniumsulfat präzipitierten 3.4% des Gesamtproteins zu einem festen, braunen Niederschlag unter der Voraussetzung, daß die Salzzugabe sehr langsam unter ständigem Rühren und unter Kontrolle des pH-Wertes erfolgte. Eine zu schnelle Zugabe verursachte eine starke Trübung der Proteinlösung durch Schwebstoffe, die bei der anschließenden Zentrifugation zum Teil mitsedimentierten.

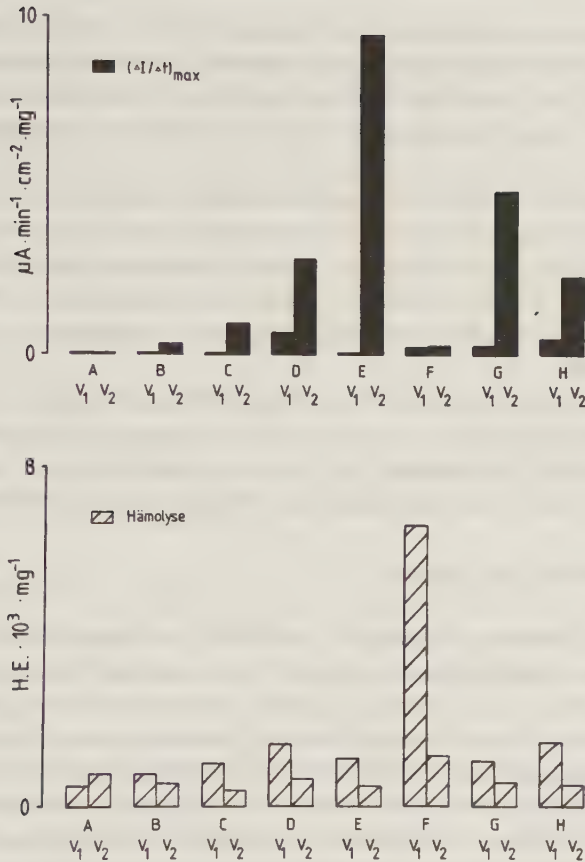


Abb. 3.3: Verteilung der spezifischen Hämolyseaktivitäten und Kanaleinbautraten in den Pilzchargen in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren

Im oberen Bildteil sind die spezifischen Kanaleinbautraten $(\Delta I / \Delta t)_{max}$ - normiert auf die Membranfläche und die eingesetzte Proteinmenge - in den nach den beiden Extraktionsverfahren V_1 und V_2 extrahierten Pilzchargen (A - H) dargestellt. Die Einheit der spezifischen Kanaleinbausrate wird in $\mu A / min \times cm^2 \times mg$ angegeben (Kapitel 2.2.1.1).

Im unteren Blockdiagramm sind die entsprechenden spezifischen Hämolyseaktivitäten gegenübergestellt, die Hämolyseaktivität wird - wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben - in der Einheit H.E./mg angegeben.

Die spezifische Kanaleinbaurate des Phalloporins betrug im 25%-igen Präzipitat nach der Dialyse $10.78 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ im Vergleich zur mittleren Kanaleinbaurate der V_2 -Extrakte von $2.61 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$. Damit kann für die Ammoniumsulfatfällung eine ca. 4.1-fache Anreicherung hinsichtlich der spezifischen Kanaleinbaurate erzielt werden.

Bei einer Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 50% (w/v) wurden zwar ca. 22% des Gesamtproteins gefällt, die Aktivität des Präzipitats nach der Dialyse war jedoch so niedrig, daß nur noch ein qualitativer Nachweis einzelner Phalloporinkanäle möglich war. Außerdem konnte eine Trübung der Proteinlösungen bei 50%-iger Salzkonzentration auch durch sehr langsame Zugabe der Trockensubstanz nicht vermieden werden.

Die Salzfällung mit 25%-iger Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration erwies sich demzufolge als effektiv zur Anreicherung und gleichzeitigen Konzentrierung der Proteinlösungen. Ist im Folgenden von ammoniumsulfatgefällten Proben die Rede, so handelt es sich stets um das Präzipitat einer 25%-igen Ammoniumsulfatfällung.

3.2.3 Gelfiltration über Sephacryl S-300

Aus den Ergebnissen zur qualitativen Untersuchung der Kanalaktivität in höher aufgereinigten Phallolysinpräparaten (Kap. 3.1) konnte geschlossen werden, daß der native Kanalbildner in den Extrakten aus *Amanita phalloides* eine höhermolekulare Komponente darstellt. Eine Gelfiltration über eine Chromatographiesäule mit höhermolekularem Trennbereich bot sich deshalb als nächster Reinigungsschritt an.

Der gesamte V_2 -Extrakt einer Pilzaufarbeitung aus ca. 2.0 kg Pilzen wurde zu diesem Zweck durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und auf einer Sephacryl S-300-Säule (Trennbereich M_r 10k - 1000k) getrennt.

An dieser Stelle sei anzumerken, daß die präparative Gelfiltration im Labor von Prof. H. Faulstich in Heidelberg durchgeführt wurde. Da die Trennung der Pilzprobe in diesem Fall vorwiegend nach quantitativen Gesichtspunkten erfolgen sollte, konnte hier die schon für die Phallolysinpräparationen verwendete Chromatographiesäule von 4.2 x 200 cm eingesetzt werden. Das Elutionsprofil der präparativen Gelfiltration ist in Abb. 3.4 wiedergegeben. Die nach Kap. 2.1.3 durchgeführten Fraktionsvereinigungen zu den Poolfraktionen FI, FII, FIII und FIV sind in der Abb. 3.4 durch die Klammern im oberen Bildteil veranschaulicht. Im Gegensatz zur in Kap. 3.1.1 beschriebenen Gelfiltration über Sephadex G-100 können nun durch die Entwicklung des Bilayertests quantitativ die spezifischen Kanaleinbauraten bzw. Hämolyseaktivitä-

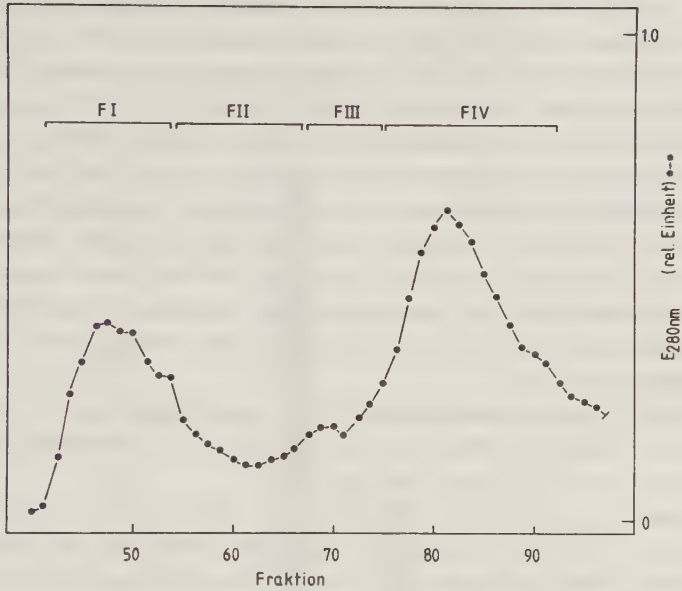


Abb. 34: Präparative Gelfiltration des ammoniumsulfatgefällten V₂-Extraktes

Der gesamte ammoniumsulfatgefällte Extrakt einer Pilzaufarbeitung aus ca. 2 kg tiefgefrorenem Pilzmaterial (ca. 2 g Gesamtprotein) wurde über eine Sephacryl S-300-Säule von 4.2 x 200 cm gelfiltriert. Das Elutionsprofil - bei 280 nm photometrisch registriert - ist in relativen Einheiten dargestellt. Mit FI, II, III und IV sind die vereinigten Fraktionspools bezeichnet, die jeweils 16,6, 9,6, 7,6 und 66 mg Protein (nach Lowry et al.) enthalten.

ten in den Poolfraktionen angegeben werden (Abb. 3.5). Die bei einer Nicht-Identität von Phallolysin und Phalloporin mögliche, ungleiche Verteilung der Aktivitäten bezüglich Kanalbildung und Hämolyse in den Fraktionen, wird durch die in Abb. 3.5 veranschaulichten Ergebnisse bestätigt. Maximale Hämolyse und maximale Kanaleinbaurate sind mit den unterschiedlichen Proteinfractionen FIV bzw. FII korreliert.

Da versäumt wurde, die spezifische Kanaleinbaurate des speziell in dieser Aufarbeitung verwendeten Ausgangsmaterials V_2 zu bestimmen, kann für die Ermittlung eines Anreicherungsfaktors lediglich eine relative Abschätzung nachvollzogen werden.

Ausgehend von den gemessenen spezifischen Kanaleinbauraten verschiedener V_2 -Extrakte, kann ein Mittelwert von $2.61 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ Kanaleinbaurate angenommen werden (Kap. 3.2.1). Damit liegt nach der durchgeführten Gelfiltration über Sephacryl S-300 in der FII-Poolfraktion mit $924 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ eine ca. 350-fache Anreicherung vor.

Hinsichtlich der hämolytischen Aktivität läßt sich aus den Aktivitäten der V_2 -Extrakte ein Mittelwert von 595 H.E./mg und damit im Vergleich zur Aktivität der FIV-Poolfraktion ein Anreicherungsfaktor von 2 abschätzen.

Ausgehend von 2.0 kg Pilzmaterial gewinnt man nach dem hier verwendeten Extraktionsverfahren ca. 2 g Gesamtprotein. Die Proteinausbeute nach der präparativen Gelfiltration beträgt mit insgesamt 102 mg Protein in allen Poolfraktionen etwa 5% des eingesetzten Gesamtproteins. Die Verteilung der Proteinausbeute in den einzelnen Fraktionen, bezogen auf das Gesamtprotein, kann entsprechend mit 0.83% für FI, 0.48% für FII, 0.38% für FIII und 3.3% für FIV angegeben werden.

In Abb. 3.6 werden im oberen Teil die Originalregistrierungen der Kanaleinbaukurven für die kanal- bzw. hämolytisch aktivsten Fraktionen FII und FIV gezeigt. In beiden Fällen ist die eingesetzte Gesamtproteinkonzentration $0.28 \mu\text{g}/\text{ml}$. Man erkennt, daß der Membranstromzuwachs nach Applikation des Kanalbildners nach ca. 1 - 5 Minuten in diskreten Stufen erfolgt. Diese Stromstufen repräsentieren die aufeinanderfolgenden Einbauprozesse einzelner Ionenkanäle in die künstliche Lipidmembran.

Im unteren Teil der Abbildung wird die graphische Ermittlung der Proteinkonzentrationen von FII und FIV veranschaulicht, die eine 50%-ige Hämolyse der Erythrozyten-Suspension bewirken. Man beachte, daß der jeweils gewählte Bereich der Proteinkonzentration unterschiedlich ist. Aus diesen Konzentrationen können - wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben - die spezifischen Hämolyseaktivitäten bestimmt werden.

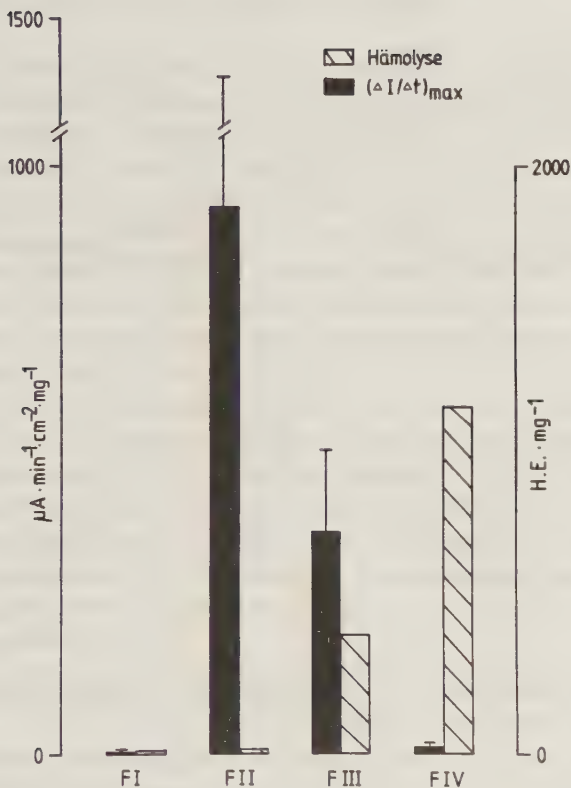


Abb. 3.5: Die Verteilung der spezifischen Hämolyseaktivitäten und Kanaleinbautraten in den vier Fraktionspools des Sephacryl S-300-Säuleneluats

In den vier Poolfraktionen FI, II, III und FIV aus der präparativen Gelfiltration wurden die spezifischen Hämolyseaktivitäten und Kanaleinbautraten gemessen und miteinander verglichen. Die Versuchsbedingungen der Bilayerexperimente waren wie folgt:

Lipid: 1,2-POPC, Cholesterol (9 : 1)
 Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5
 Membranspannung: +50 mV
 Proteinkonzentration: 0.28 $\mu g/mi$

Anzahl der Bilayerexperimente: FI: 5, FII: 8, FIII: 10, FIV: 10

Die Hämolyseaktivitäten in den Fraktionspools wurden in Einzelmessungen bestimmt.

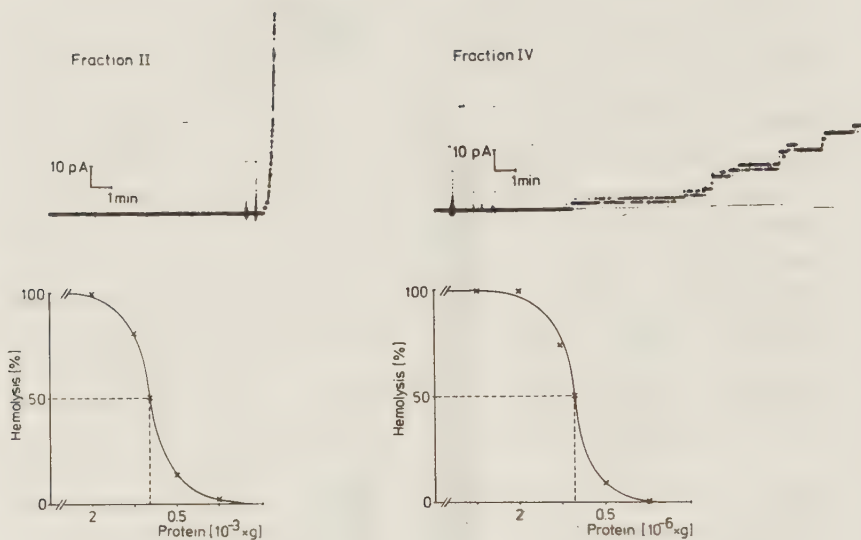


Abb. 3.6: Kanaleinbautraten und Hämolyseaktivitäten in den Poolfraktionen FII und FIV aus der präparativen Gelfiltration

Im oberen Teil der Abbildung sind die Originalregistrierungen zur Bestimmung der Kanaleinbauraten in der FII- bzw. FIV-Fraktion dargestellt. Versuchsbedingungen finden sich unter Abb. 3.5. wieder. Das kurzzeitige erhöhte Stromrauschen markiert die Zugabe des Proteins (je $0.28 \mu\text{g}/\text{ml}$) zum undotierten Bilayer. Die Bestimmung der Hämolyseaktivität nach der Methode von Faulstich und Weckauf-Bloching (1974) in den beiden Poolfraktionen FII und FIV ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen. Der Verdünnungsfaktor der Proteinprobe, bei dem unter den Versuchsbedingungen (Kap. 2.2.2) eine 50%-ige Hämolyse der Erythrozytensuspension auftritt, wird graphisch ermittelt (gestrichelte Linie) und gemäß Gleichung 2.3 im Kapitel 2.2.2 - auf das Probenvolumen und die Proteinmenge normiert - als spezifische Hämolyseaktivität in H.E./mg angegeben. Man beachte, daß die Proteinskalierungen bei den Fraktionen verschieden sind.

3.2.4. Isolierung von Phalloporin durch differentielle Zentrifugation

Die erhaltenen höheren spezifischen Kanaleinbauraten unter Verwendung des V_2 -Extraktionsverfahrens ließen vermuten, daß durch den mechanischen Zellaufschluß (Homogenisation) freigesetzte, intrazelluläre Zellkomponenten mit der kanalbildenden Eigenschaft des Phalloporins assoziiert sind. Eine grobe Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation bot daher eine weitere Möglichkeit zur Isolierung bzw. Anreicherung des Kanalbildners. Die Arbeitsweise der Differentialzentrifugation beruht auf den verschiedenen Sedimentationskonstanten einzelner Partikel verschiedener Größe und Dichte. Durch die stufenweise Erhöhung der Zentrifugationskraft kann das Gewebehomogenisat in verschiedene Fraktionen mit charakteristischem Zellmaterial ab-sedimentiert werden (Williams und Wilson, 1984).

Im vorliegenden Fall erhält man theoretisch im ersten Zentrifugationsschritt ein Pellet vorwiegend aus Zelldebris, Zellkernen und intakten Zellen (Cooper und Beevers, 1969). Bei den anschließenden Zentrifugationen sedimentieren vor allem Mitochondrien, Plasma- und ER-Membranen, so daß der nach der Ultrazentrifugation zurückbleibende Überstand hauptsächlich aus Cytoplasma, freien Ribosomen und gelösten Proteinmolekülen besteht. Neben der Anreicherung des Kanalbildners kann daher die Differentialzentrifugation näherungsweise Aufschluß über die Lokalisation des Phalloporins in der Pflanzenzelle geben.

In der Tabelle 3.2 werden die spezifischen Kanaleinbauraten und die Proteinausbeuten in den Zellfraktionen in Relation zum Homogenisat aufgeführt:

Tabelle 3.2

Fraktion	Menge [ml]	Protein [mg]	Proteinausbeute [%]	spez. Kanaleinbaurate [$\mu A / \min \times cm^2 \times mg$]	Anreicherung
Homogenisat	800	1144	100	1.50	1
P-4 000	180	259	22.5	0.40	0.27
Ü-4 000	490	298	25.9	1.50	1
P-8 000	30	18.6	1.6	0.21	0.14
Ü-8 000	375	187.5	16.3	2.52	1.68
P-20 000	10	6.4	0.6	0.20	0.13
Ü-20 000	261	135.7	11.8	1.17	0.78
P-36 000	10	15.2	1.3	0.47	0.31
Ü-36 000	252	126	11.0	6.14	4.10

Nach allen Zentrifugationsschritten sind die höheren Kanaleinbauraten in den Überstandsfractionen wiederzufinden. Den größten Anreicherungsfaktor von 4.1 bezüglich der Kanaleinbaurate erhält man im Überstand der Ultrazentrifugation bei 150 000 xg. Die Verteilung der spezifischen Kanaleinbauraten in den Zellfraktionen läßt die Interpretation zu, daß unter den vorgegebenen Bedingungen (pH-Wert, Ionenmilieu) das Phalloporin zum größten Teil als wasserlösliche Cytosolkomponente in der Pflanzenzelle vorliegt. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse eines weiteren Experimentes unterstützt:

Ausgangsmaterial für die Ultrazentrifugation (3 Stunden bei 150 000 xg) war in diesem Fall eine 60 ml-Probe des EV₂-Extraktes (Kap. 2.1.1) mit einer spezifischen Kanaleinbaurate von 7.56 $\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$. Das im Isolationspuffer resuspendierte Pellet (EV₂-P-36 000) und der Überstand (EV₂-U-36 000) aus dem Zentrifugationsschritt werden jeweils mit einer Lösung des nicht-ionischen Detergenz n-Octylglucosid (Serva) im Verhältnis Detergenz : Protein = 25 mg : 1 mg 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend vier Minuten bei 8 000 xg abzentrifugiert. Zum Entfernen des Detergenz werden die erhaltenen Überstände daraufhin 3 x 8 Stunden gegen jeweils 100 Vol. Isolationspuffer dialysiert.

Die Hinweise zu diesem Versuch beruhen auf Untersuchungen von Zampighi et al. (1985) und Young et al. (1982), die membrangebundene, kanalbildende Proteine aus der Rinderlinse und dem einzelligen Parasit *Entamoeba histolytica* mit dem Detergenz n-Octylglucosid aus ultrazentrifugierten Membranfragmenten solubilisieren und in planare Lipidbilayer rekonstituieren konnten.

Unter der Annahme, es handele sich bei dem Phalloporinkanal ebenfalls um ein integrales Membranprotein, kann zur Isolierung des membranassoziierten Proteinkomplexes eine vorübergehende Solubilisierung mit einem Detergenz notwendig sein, um den so in Lösung gebrachten Proteinanteil in den Lipidbilayern rekonstituieren zu können.

Die spezifischen Kanaleinbauraten in den Proteinproben des obengenannten Versuchs vor und nach der Solubilisierung mit n-Octylglucosid sind in der Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3

Fraktion	spez. Kanaleinbaurate	spez. Kanaleinbaurate
	$[\mu A / \min \times cm^2 \times mg]$	$[\mu A / \min \times cm^2 \times mg]$
	- Detergenz	+ Detergenz
EV ₂ -Extrakt	7.56	-
EV ₂ -P-36 000	0.29	0.46
EV ₂ -U-36 000	28.85	24.05

Der mit n-Octylglucosid inkubierte Überstand (EV₂-U-36 000) dient als Kontrollwert, um den Einfluß des Detergenz auf die vorhandene Kanaleinbaurate zu bestimmen und kann den Werten entsprechend, als geringfügig angesehen werden. Eine etwaige Denaturierung des Kanalproteins durch das Detergenz kann damit ausgeschlossen werden. Die Aktivität in der Fraktion der Membranfragmente (EV₂-P-36 000) läßt sich durch die Anwesenheit des Detergenz um das 1.6-fache steigern, was auf einen geringen membranassoziierten, durch n-Octylglucosid solubilisierbaren Anteil des Kanalbildners dieser Fraktion zurückzuführen ist.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß neben dem milden, nicht-ionischen Detergenz in Vorversuchen auch NP-40 und Chaps als Detergenzien an den Membransedimenten in gleicher Weise ausgetestet wurden. Die Detergenzrückstände beeinträchtigten jedoch selbst nach dreitägiger Dialyse die Bilayermessung derart, daß weder quantitativ noch qualitativ Aussagen über die Kanalaktivität der solubilisierten Proteinproben gemacht werden konnten.

Im Gegensatz dazu kann das Octylglucosid wegen seiner relativ hohen kritischen Micellkonzentration (cmc) von 25 mM leichter durch Dialyse aus der Proteinlösung entfernt werden. Die daraufhin minimalen Detergenzrückstände machen sich im Bilayer-Test nur dann bemerkbar, wenn aufgrund sehr geringer Proteinkonzentrationen Volumina von mehr als 50 μl des Dialysats eingesetzt werden müssen.

3.2.5 DEAE-Ionenaustauschchromatographie

Aufgrund der großen Probenvolumina der kanalaktivsten Fraktionen aus der differentiellen Zentrifugation und der Ultrazentrifugation des EV₂-Extraktes (Kap. 3.2.4) wurde für die weitere Aufreinigung eine Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren durchgeführt (Kap. 2.1.3). Die Verteilung der spezifischen Kanaleinbauten in den jeweils erhaltenen fünf Proteinfractionen nach der DEAE-Chromatographie sind in Abb. 3.7 a) bzw. Abb. 3.7 b) im Vergleich zu den Ausgangsmaterialien repräsentiert. Die Angaben zur Proteinausbeute beziehen sich auf die auf je 100% gesetzten Proteingehalte der Überstandsfractionen U-36 000 und EV₂-U-36 000 (Kap. 3.2.4).

a) U-36 000

Als ungebundenes Proteinmaterial bleiben im Falle des Batch-Verfahrens mit U-36 000 ca. 50.8% des eingesetzten Proteins im Überstand DEAE-E-20 zurück (Abb. 3.7 a), [c]). Auf die restlichen vier Fraktionen verteilen sich nur ca. 9.2% des Gesamtproteins (Abb. 3.7 a), [d, e, f und g]).

Aus dem an die DEAE-Matrix gebundenen Proteinmaterial lassen sich mit 200 [e] bzw. 400 mM [f] NaCl-Lösung 2.1% bzw. 1.8% Protein eluieren. Die spezifischen Kanaleinbauten liegen in diesen beiden Fraktionen um das 11.4- bzw. 32-fache höher als im Ausgangsmaterial (Homogenisat). Mit der 100 mM NaCl-Lösung eluieren 4.4% Protein [d], die spezifische Kanaleinbaurate dieses Eluats ist im Vergleich zum Homogenisat sogar geringer. In dem 800 mM-Eluat [g] ist keine Kanalinkorporation mehr feststellbar. In Abb. 3.8 sind Originalregistrierungen der Kanaleinbaukurven für die Proben: DEAE-E-20 [c], -E-100 [d], -E-200 [e] und -E-400 [f] gezeigt. Mit Ausnahme der DEAE-100-Probe (1.35 µg/ml) wurden in den Tests Proteinkonzentrationen von 0.67 µg/ml verwendet. Nach Applikation des Kanalbildners kann nach der Verzögerungszeit t_{lag} (Kap. 1.3), also dem Zeitraum zwischen dem Moment der Zugabe und dem Auftreten des ersten Phalloporinkanals, die Membranstromzunahme in Form diskreter Stromstufen einzelner Ionenkanäle beobachtet werden. Mit zunehmendem Anteil des kanalbildenden Proteins an der eingesetzten Proteinkonzentration wächst die maximale Steigung der Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{max}$.

Darüberhinaus ist zu erkennen, daß parallel dazu die Verzögerungszeit t_{lag} verringert wird. Nach Wilmsen (1987) kann bei doppeltlogarithmischer Auftragung der Verzögerungszeit in Abhängigkeit von der Phalloporinkonzentration eine lineare Beziehung in der Weise gefunden werden, daß mit höheren Proteinkonzentrationen ebenfalls eine Verringerung der Verzögerungszeit einhergeht.

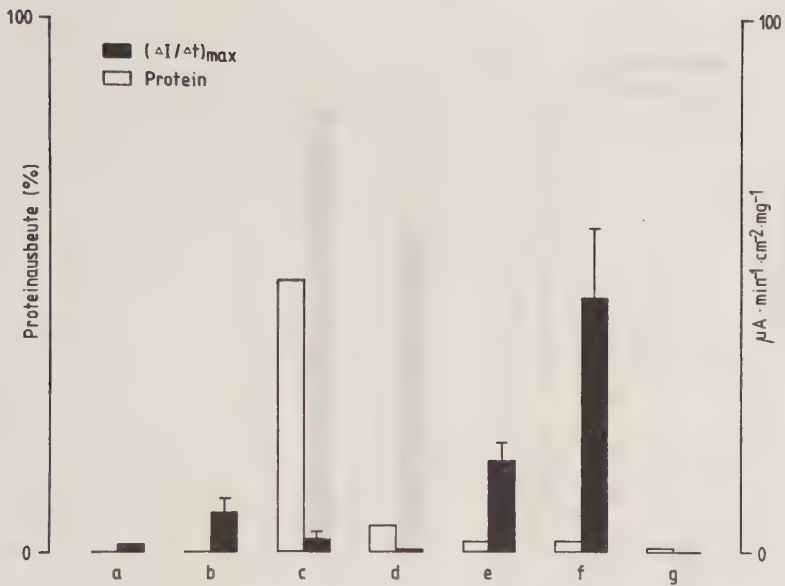


Abb. 3.7 a): DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren der Überstandsfraktion U-36000 aus der differentiellen Zentrifugation

Die Abbildung zeigt die Verteilung der spezifischen Kanaleinbauraten [c , d, e, f, g] aus der DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Vergleich zum Homogenisat [a] und der Überstandsfraktion (U-36000) [b] aus der differentiellen Zentrifugation. Die Proteinangaben in dem Blockdiagramm beziehen sich auf das zu 100% gesetzte Ausgangsmaterial (U-36000) der Chromatographie. Die Anzahl der Bilayerexperimente ist in Klammern angegeben: [a] Homogenisat (1), [b] U-36000 (3), [c] DEAE-E-20 (3), [d] DEAE-E-100 (1), [e] DEAE-E-200 (3), [f] DEAE-E-400 (3), [g] DEAE-E-800 (2). Die experimentellen Bedingungen zur Bestimmung der Kanaleinbauraten sind unter Abb. 3.5 wiedergegeben. Die eingesetzte Proteinkonzentration variierte zwischen 0.57 - 2.0 $\mu g/ml$.

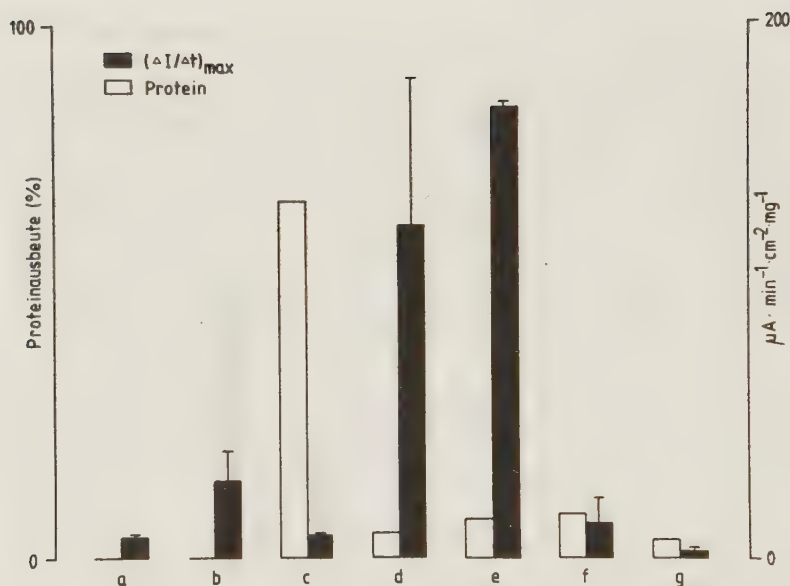


Abb. 37 b): DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren der Überstandsfraction EV_2 -U-36 000

Ausgangsmaterial für die Ionenaustauschchromatographie war in diesem Fall die Überstandsfraction (EV_2 -U-36 000) aus der direkten Ultrazentrifugation (3 h, 150 000 xg) eines Aliquots des EV_2 -Extraktes (Kap. 2.1.1, Kap. 3.2.4). Die Proteinangaben beziehen sich auf das zu 100% gesetzte Ausgangsmaterial EV_2 -U-36 000 [b] der Chromatographie. Die Anzahl der ausgewerteten Bilayerexperimente ist in Klammern angegeben: [a] EV_2 -Extrakt (3), [b] EV_2 -U-36 000 (5), [c] DEAE-E-20 (2), [d] DEAE-E-100 (2), [e] DEAE-E-200 (2), [f] DEAE-E-400 (2), [g] DEAE-E-800 (2). Die experimenteilen Bedingungen können - wie unter Abb. 3.5. dargestellt - mit Ausnahme einer Variation der eingesetzten Proteinkonzentration von 0.28 - 0.68 $\mu g/ml$ angegeben werden.

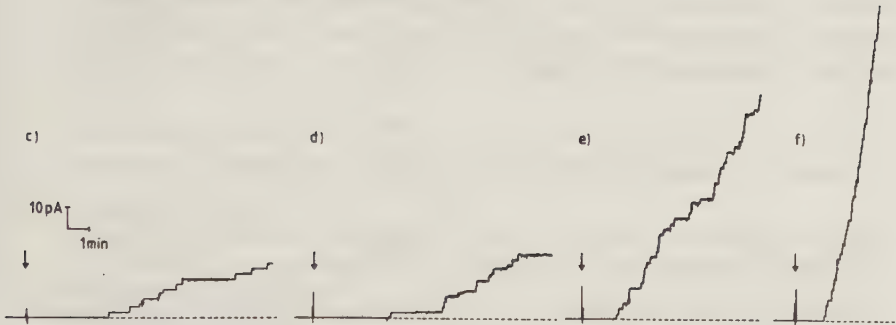


Abb. 38: Einbaukurven der Proteinfractionen aus der Ionenaustauschchromatographie mit Ü-36000 als Ausgangsmaterial

Repräsentativ für die Bilayerexperimente mit den Proteinfractionen aus der Ionenaustauschchromatographie sind hier die Einbaukurven nach Applikation (Pfeil) der Eluatproben DEAE-E-20 [c], DEAE-E-100 [d], DEAE-E-200 [e], DEAE-E-400 [f] gezeigt. Ausgangsmaterial dieser Chromatographie war die Überstandsfraktion Ü-36000 aus der differentiellen Zentrifugation. Die Proteinkonzentrationen betrugen mit Ausnahme von [d] mit 1.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in [c], [e] und [f] 0.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der Einbau einzelner Phalloporinkanäle ist in Form diskreter Stromstufen erkennbar. Die maximale Einbaurate $(\Delta N / \Delta t)_{\text{max}}$ und damit der maximale Stromzuwachs $(\Delta I / \Delta t)_{\text{max}}$ kann aus der Steigung der angelegten Tangente ermittelt werden. Normiert auf die Membranfläche und die eingesetzte Proteinmenge ergibt sich die spezifische Kanaleinbaurrate in $\mu\text{A} / \text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$.

b) EV₂-Ü-36 000

Die Proteinausbeute nach der DEAE-Chromatographie des durch Ultrazentrifugation erhaltenen EV₂-Extraktes beträgt im ungebundenen Zustand (DEAE-E-20) ca. 67% und im gebundenen Zustand ca. 22% des eingesetzten Proteinmaterials (Abb. 3.7 b)). Die Fraktionen höchster Kanaleinbauraten korrelieren mit den 100- bzw. 200 mM NaCl-Eluaten, die 4.4 bzw. 6.8% des gesamten Proteins ausmachen. Die maximal erreichte spezifische Kanaleinbaurate 200 mM NaCl-Eluat liegt um das 22.3-fache höher, als die spezifische Einbaurate des EV₂-Extraktes.

3.2.6 Vergleich der präparativen Methoden zur Isolation des Phalloporins

In den vorausgegangenen Kapiteln (3.2.1 - 3.2.5) wurden die Ergebnisse aus den verwendeten unterschiedlichen Präparationstechniken zur Aufreinigung des Kanalbildners Phalloporin vorgestellt. In der Tabelle 3.4 sind die für die Anreicherung und Isolation des Proteins entscheidenden Kriterien, wie spezifische Einbaurate, Proteinausbeute und Anreicherungsfaktor für die verschiedenen Präparationsschritte und den daraus resultierenden kanalaktivsten Proteinproben gegenübergestellt (Abb. 3.9).

Die Proteinausbeuten und die Anreicherungsfaktoren beziehen sich gemäß Tabelle 3.4 jeweils auf die Ausgangsmaterialien der Aufreinigungsprozedur. Für die V₁- bzw. V₂-Extrakte sind der Mittelwert der spezifischen Kanaleinbauraten und der Proteinausbeuten aus allen ausgewerteten Extrakten (A - H) angegeben.

Unter dem Aspekt, eine möglichst hohe Anreicherung in der spezifischen Kanaleinbaurate zu erzielen, erweist sich die Gelfiltration des ammoniumsulfatgefällten V₂-Extraktes als geeignetster Präparationsschritt. Die Proteinausbeute ist mit $\leq 0.48\%$ im Verhältnis zum anfänglichen Gesamtprotein jedoch sehr gering.

Aus der differentiellen Zentrifugation mit anschließender Ionenaustauschchromatographie resultiert eine geringere Anreicherung hinsichtlich der Kanaleinbaurate mit gleichzeitig hohem Materialverlust.

Der durch Ultrazentrifugation erhaltene EV₂-Extrakt führt zu einem vergleichbaren Anreicherungsfaktor hinsichtlich der Kanaleinbaurate, die Proteinausbeute ist jedoch wesentlich günstiger.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades und zur Bestimmung der relativen molaren Massen wurden die kanal- bzw. hämolytisch aktivsten Proben auf SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli aufgetrennt. Die entsprechenden Gelspuren für das EV₂-Ausgangsmaterial und das kanalaktivste Eluat DEAE-200 unterscheiden sich, wie

Tabelle 3.4

Präparationsschritt	spez. Kanaleinbaurate [$\mu\text{A} / \text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$]	Protein [mg]	Proteinausbeute [%]	Anreicherung
<u>Extraktion</u>				
V ₁ -Extrakt	0.22	1 500		
V ₂ -Extrakt	2.61	1 000	100	1
<u>AS-Fällung (25%, w/v)</u> (V ₂ -Extrakt)	10.78	68	3.40	4.1
<u>Gelfiltration (S-300)</u>				
F II-Poolfraktion	924.00	9.6	0.48	354
<u>Differentielle Zentrifugation</u> (tiefgefrorenes Pilzmaterial)				
Homogenisat	1.50	1 144	100	1
Ü-36 000	6.14	126	11	4.1
<u>Ionenaustauschchrom. (DEAE)</u>				
DEAE-E-400	48.06	2.3	0.25	32
<u>Differentielle Zentrifugation</u> (EV ₂ -Extrakt)				
EV ₂ -Extrakt	7.56	13.75	100	1
EV ₂ -Ü-36 000	28.85	9.3	67.6	3.8
<u>Ionenaustauschchrom. (DEAE)</u>				
EV ₂ -DEAE-200	168.63	0.63	4.6	22.3

Abb. 3.9: Tabellarischer Vergleich der präparativen Methoden zur Isolation des Phalloporins

Die Anreicherungsfaktoren und die Angaben zur Proteinausbeute, die entsprechend auf 1 bzw. 100% gesetzt wurden, beziehen sich jeweils auf das Ausgangsmaterial der gesamten Aufreinigungsprozedur.

Abb. 3.10 a) zeigt, deutlich. Durch den Reinigungsschritt der Ionenaustauschchromatographie werden vor allem die 34k-, 36k- und 64k-Proteinkomponenten aus der Überstandsfraction der Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Anzahl der verbleibenden Proteinbanden zwischen 50k und 12k ist jedoch noch so hoch, daß eine Identifizierung des Kanalbildners gelelektrophoretisch in diesem Stadium nicht möglich ist.

Nach der Gelfiltration des ammoniumsulfatgefällten V_2 -Extraktes hat sich die Zahl der Hauptproteinbanden in der kanalaktivsten FII-Poolfraktion auf zwei mit 19k und 14k relativer molarer Masse reduziert (Abb. 3.10 b)).

Beide Banden können ebenfalls in dem kanalaktivsten Eluat DEAE-E-200 der Ionenaustauschchromatographie identifiziert werden.

Densitometrisch kann der Anteil der 19k-Bande mit ca. 65% und der der 14k-Bande mit 28% des aufgetragenen Proteinmaterials angegeben werden. In länger gelagerten (bei 4°C) lyophilisierten FII-Proben stellte sich aufgrund der Alterung nach einigen Monaten ein Verhältnis von 56% : 42% (19k/14k) ein, das dann jedoch über mehrere Monate hin konstant blieb. Der 14k-Proteinanteil erhöhte sich damit zuungunsten der 19k-Proteinbande, was durch eine altersbedingte Degradation der 19k-Bande erklärt werden könnte. Als schwach gefärbte Nebenbande läßt sich zusätzlich in der FII-Fraktion eine 64k-Proteinbande nachweisen.

Im Vergleich dazu weist die hämolytisch aktivste Fraktion FIV ein ganz anderes Proteinbandenmuster auf. Nach der SDS-Elektrophorese trennt sich das Aliquot der FIV-Poolfraktion in zwei Hauptbanden mit 26k (56% des Gesamtproteins) und 12k (38% des Gesamtproteins) relativer molarer Masse auf.

Eine 34k- und eine 17k-Komponente sind darüberhinaus als schwach gefärbte Nebenbanden vorhanden. Über die mögliche Zuordnung der Banden zu den kanal- bzw. hämolytisch aktiven Substanzen soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

3.2.7 Methanol-Präzipitation

3.2.7.1 Phalloporin

Der spontane Einbau des wasserlöslichen Kanalbildners in künstliche Lipidmembranen läßt vermuten, daß das Molekül zum Teil hydrophobe Bereiche besitzt, die unter entsprechenden äußeren Bedingungen (pH-Wert, unpolares Lösungsmittel) zur Molekül-

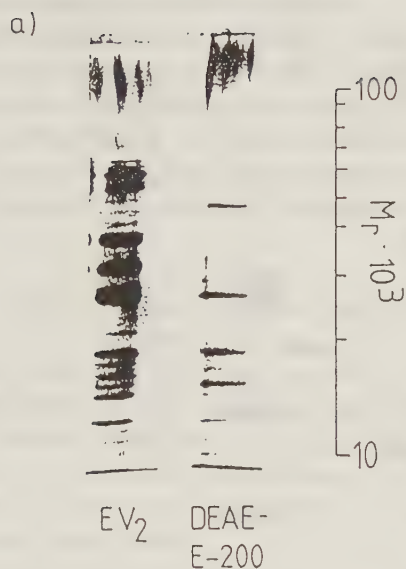


Abb. 310 a): Gelelektrophoretischer Vergleich des EV₂-Extraktes mit der teilweise über Ultrazentrifugation und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigten Phalloporinprobe DEAE-E-200

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der teilweise aufgereinigten Phalloporinpräparation und zur Molmassenbestimmung der Einzelkomponenten wurden die Proben EV₂ und DEAE-E-200 auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel nach Kapitel 2.2.5 aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die aufgetragenen Proteinmengen betragen im Falle des EV₂-Extraktes 10,5 µg und für die teilweise aufgereinigte Probe DEAE-E-200 9 µg (nach Lowry et al.). Als Markerproteine dienten Cytochrom C (M_r 12,4k), GAPD (M_r 36k), und BSA (M_r 67k).

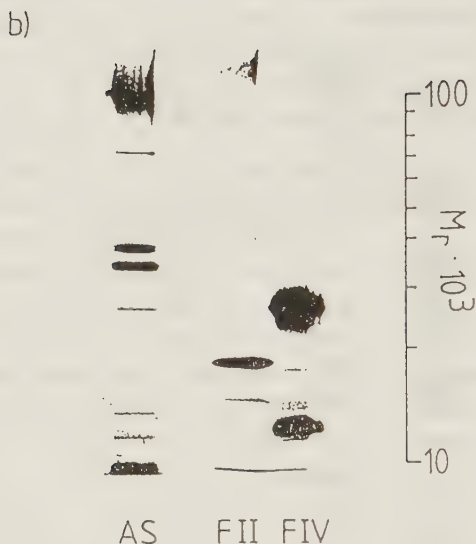


Abb. 310 b): Gelelektrophoretischer Vergleich des ammoniumsulfatgefällten V_2 -Extraktes mit den kanal- und hämolytisch aktivsten Fraktionen FII und FIV aus der präparativen Gelelektrophorese

Aliquote der FII- bzw. FIV-Poolfraktion aus der Sephacryl S-300-Säulenchromatographie wurden auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Die aufgetragenen Proteinmengen betrugen für die FII- und die FIV-Probe je 5 μg im Vergleich zu 7.5 μg der ammoniumsulfatgefällten Probe des V_2 -Extraktes (AS). Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und die Proteinanteile mit den Gelspuren der FII- und FIV-Probe in einem Eppendorf-Photometer (Pherogramm-Auswerter 2602) bei 546 nm densitometrisch bestimmt. Aus der Gesamtfläche des Densitogramms und den Flächenanteilen unter den Proteinpeaks lassen sich durch Ausschneiden und anschließendem Auswiegen die relativen Anteile der einzelnen Proteinkomponenten am Gesamtprotein ermitteln (Kapitel 3.2.6).

außenseite exponiert werden können, um somit den Übergang von der wäßrigen in die hydrophobe Lipidphase des Bilayers zu gewährleisten

Die Proteinproben aus der differentiellen Zentrifugation (U-36000) und eine Probe der FII-Poolfraktion wurden aus diesem Grund in ihrem Löslichkeitsverhalten gegenüber dem organischen Lösungsmittel Methanol untersucht. Die bei den drei Endkonzentrationen 10%, 25% und 50% Methanol (im Falle des FII-Fraktionspools nur 25% und 50%) präzipitierenden Proteinsedimente und die entsprechenden Überstände wurden im Anschluß an die Fällung auf Proteingehalte und Kanaleinbauraten getestet.

a) U-36000

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen des Überstandes aus der differentiellen Zentrifugation sind in Abb. 3.11 dargestellt.

Mit zunehmender Methanolkonzentration steigt der Anteil der in Lösung gebrachten Proteinmenge bis auf 87.1% des eingesetzten Proteins. Bei der 10%-igen bzw. 25%-igen Endkonzentration Methanol können analog dazu höhere spezifische Kanaleinbauraten in den Überständen gemessen werden, die im Vergleich zum Überstand U-36000 mit $1.14 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ um das 1.4- bzw. 1.7-fache höher liegen als die spezifische Kanaleinbaurate des Ausgangsmaterials.

Bei einer 50%-igen Endkonzentration ist trotz des hohen Proteinanteils kaum Kanalaktivität in dem Überstand nachzuweisen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Methanolkonzentration hier so hoch, daß eine Denaturierung des Phalloporins eintritt, die auch mit anschließender Dialyse nicht rückgängig gemacht werden kann.

b) FII-Fraktionspool

Um diesen denaturierenden Effekt durch das Methanol möglichst gering zu halten, wurden im Falle der FII-Präzipitierung mit 25% und 50% Methanol die Überstände sofort nach der Fällung und Zentrifugation 1 : 1 (v/v) mit Puffer verdünnt und damit auf eine Endkonzentration von maximal 25% Methanol gebracht.

In der Tabelle 3.5 sind die Proteingehalte und die spezifischen Kanaleinbauraten, sofern bestimmbar, in den Überstands- und Pelletfraktionen nach 25%-iger und 50%-iger Methanolfällung gegenübergestellt.

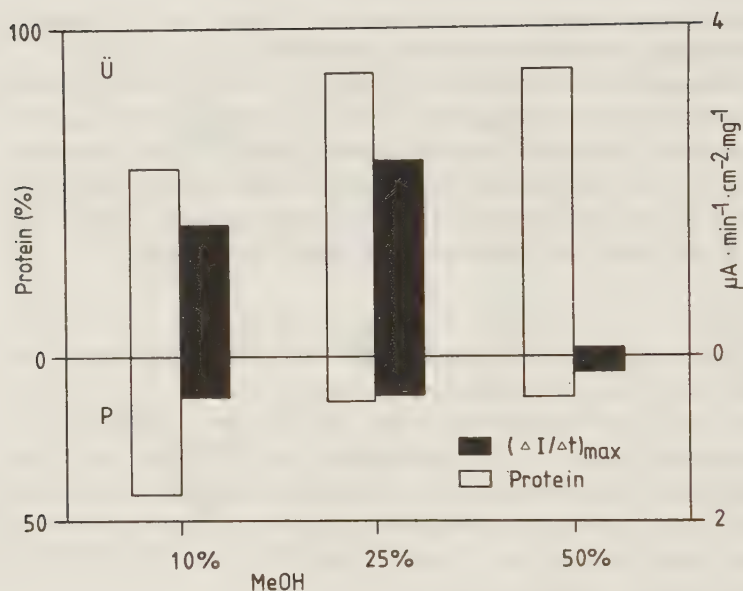


Abb. 311: Methanol-Präzipitation des Überstands U-36000 aus der differentiellen Zentrifugation

In einer Endkonzentration von je 10%, 25% und 50% Methanol wurden Aliquots des Überstands U-36000 aus der differentiellen Zentrifugation gefällt und anschließend abzentrifugiert (Kapitel 2.1.7). Der prozentuale Proteingehalt in den jeweiligen Überstands- (Ü) und Pelletproben (P) bezieht sich auf den zu 100% gesetzten Proteingehalt des entsprechenden Aliquots. Die spezifischen Kanaleinbautraten wurden in den Überstands- und Pelletproben in Bilayerexperimenten - wie unter Abb. 3.5 beschrieben - bestimmt.

Tabelle 3.5

Probe	Proteingehalt [%]	spez. Kanaleinbaurate [$\mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$]
FII		10.96 (2)
FII, Ü 25	88.6	21.20 (2)
FII, P 25	11.4	0.26 (2)
FII, Ü 50	93.0	* (s. u.)
FII, P 50	7.0	— (2)

Der Proteingehalt bezieht sich auf den je zu 100% gesetzten Gesamtproteingehalt in den Überstands- und Pelletproben nach 25%-iger bzw. 50%-iger Methanolfällung. Die Anzahl der durchgeführten Bilayerversuche ist in Klammern angegeben.

Aus der FII-Probe bleiben demnach bei ansteigender Methanolkonzentration maximal 93% des Proteins in der organischen Phase, nur noch 7% des Proteins präzipitieren bei 50%-iger Methanolkonzentration. In den Pelletproben ist nur noch im Falle des 25%-igen Proteinpellets Kanalaktivität zu bestimmen. Bei der Überstandssprobe nach 50%-iger Methanolfällung kann aufgrund eines modifizierten Einbauverhaltens, das im folgenden Abschnitt näher erläutert wird, jedoch keine spezifische Kanaleinbaurate über die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{\text{max}}$ ermittelt werden. Dazu seien an dieser Stelle die Originalregistrierungen der Einbaukurven für die 25%-ige und die 50%-ige Überstandssprobe im Vergleich zum Ausgangsmaterial FII gezeigt (Abb. 3.12 a), b) und c)).

Im 25%-igen Überstand bleibt die Kanalinkorporation - wie beim Ausgangsmaterial FII (Abb. 3.12 a)) - als Folge diskreter Stufen einzelner Ionenkanäle erhalten (Abb. 3.12 b)). Ebenso wächst anfänglich der Strom linear mit der Zeit an. Die maximale Steigung der Stromzuwachsrate erreicht einen Wert von $24.2 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$ und liegt damit um das 2.2-fache höher als die mittlere Einbaurate in der unbehandelten FII-Probe mit $10.96 \mu\text{A}/\text{min} \times \text{cm}^2 \times \text{mg}$. Bei der 50%-igen Methanolfällung kann durch die schnelle Verdünnung des Methanol-Überstandes vor der Dialyse der denaturierende Effekt auf ein Minimum herabgesetzt werden. Wie man an Abb. 3.12 c) jedoch erkennt, hat sich das Einbauverhalten des Phalloporinkanals drastisch verändert. Nach Applikation der 50%-Überstandssprobe zu einem undotierten Bilayer ist zwar immer noch eine Membranstromzunahme zu registrieren, die Membranleitfähigkeit nimmt jedoch immer schneller mit der Zeit zu. Diskrete Einzelkanalfluktuationen lassen sich nicht mehr auflösen.

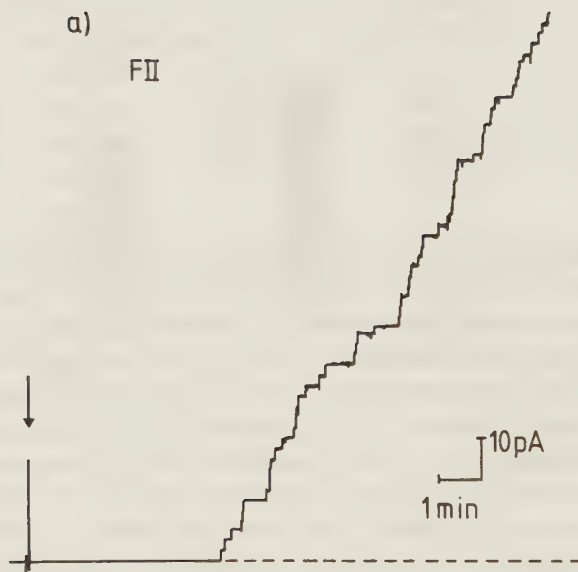


Abb. 312 a): Originalregistrierungen der Einbaukurven

Nach Applikation (Pfeil) eines Aliquotes der FII-Poolfraktionen kann der Membranstromzuwachs bei größerer Stromauflösung durch sukzessiven Einbau einzelner Phalloporinkanäle mit einem konstanten Leitwert von 52 pS in 1 M NaCl-Lösung registriert werden. Die Proteinendkonzentration beträgt 2.8 µg /ml.

Lipid: 1,2-POPC, Cholesterol (9 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Membranspannung: +50 mV

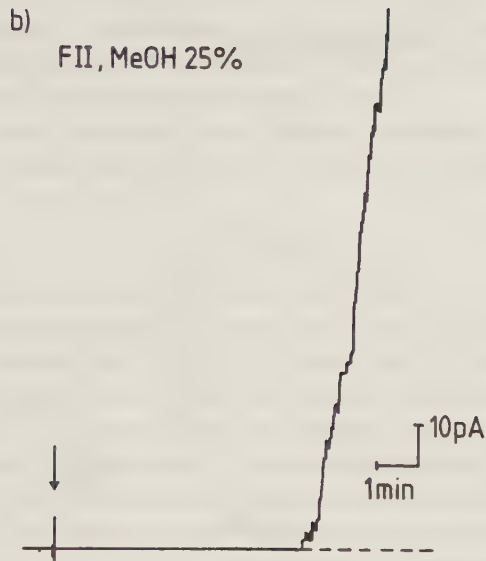


Abb. 312 b):

Ein Aliquot der FII-Poolfraktion wurde mit 25%-iger Methanolendkonzentration im Eisbad gefällt und sofort abzentrifugiert. Der Überstand (FII, MeOH 25%) wurde anschließend 1 : 1 (v/v) mit Puffer (20 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl, pH 7.4) verdünnt und mindestens zwei Stunden dialysiert. In der Abbildung ist der Einbau von Phalloporinkanälen nach Applikation eines Aliquotes des 25%-igen Methanol-Überstandes (2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinkonzentration) zu einem undotierten Bilayer gezeigt. Die experimentellen Bedingungen sind unter Abb. 312 a) wiedergegeben.

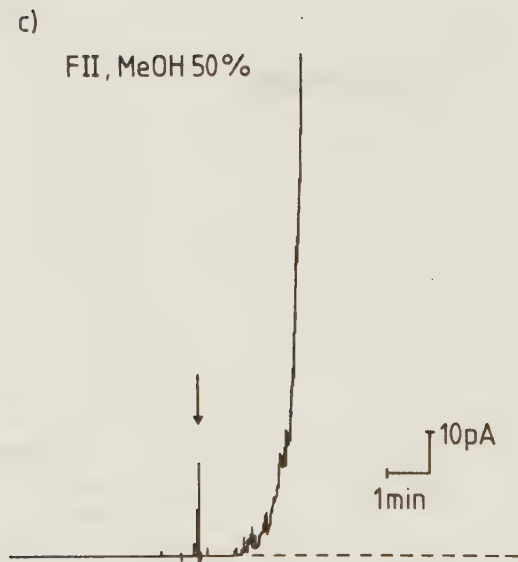


Abb. 312 c):

Ein Aliquot der FII-Poolfraktion wurde, wie unter 3.12 b) beschrieben, diesmal mit 50%-iger Methanolendkonzentration gefällt. Der Überstand (FII, MeOH 50%) wurde ebenfalls 1 : 1 mit Puffer verdünnt und dialysiert. Nach Applikation eines Aliquotes dieser Überstandsprobe (2.8 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) erhöht sich die Membranleitfähigkeit exponentiell mit der Zeit.

Darüberhinaus ist zu beachten, daß trotz gleicher Proteinkonzentration die Verzögerungszeit t_{lag} (Kapitel 1.3.2.2) in diesem Fall wesentlich kürzer ist, als in Abb. 3.12 a) und 3.12 b) (s. dazu auch Diskussion).

Auffällig ist darüberhinaus, daß sich trotz gleicher Proteinkonzentration die Verzögerungszeit t_{lag} im Falle der 50 % Überstandsprobe auf 20 % der anfänglichen Zeit (FII-Probe) reduziert (s. Diskussion).

Da durch den mit der Zeit schneller werdenden Membranstromzuwachs die Bestimmung der spezifischen Kanaleinbaurate über die lineare Stromzuwachsrate $(\Delta I / \Delta t)_{max}$ nicht mehr möglich ist, muß eine andere Art der Darstellung zur quantitativen Beschreibung des Kanaleinbaus konzipiert werden.

Vorausgesetzt es handelt sich bei dem durch Methanol modifizierten Kanaleinbau in Lipidmembranen um einen einfach exponentiellen Prozeß, kann der Stromzuwachs ΔI formal beschrieben werden als:

$$\Delta I \sim e^{t/\tau} \quad (3.1)$$

Bei halblogarithmischer Auftragung der Stromzunahme I durch die methanolgelöste Kanalkomponente in Abhängigkeit von der Zeit lassen sich in der Tat die Datenpunkte mit einer Geraden nähern (Abb. 3.13). Ein Befund, der die formale Beziehung in Gleichung (3.1) als grundlegenden Prozeß des modifizierten Einbauverhaltens bestätigt. Die Zeitkonstante τ , d. h. die Steigung der Geraden oder mit anderen Worten, der Zeitraum, in dem der Membranstrom I auf das e -fache angestiegen ist, kann als möglicher Parameter zur Beschreibung eines exponentiellen Kanaleinbaus dienen. In dem vorliegenden Fall beträgt $\tau = 0.3$ Minuten bei einer entsprechenden Proteinkonzentration von $2.8 \mu\text{g/ml}$. Eine direkte Vergleichbarkeit der spezifischen Kanaleinbauraten vor und nach der 50%-igen Methanolfällung ist aufgrund des vollkommen anderen Einbauverhaltens nicht möglich (siehe oben).

Zur Überprüfung der Stabilität der Proteinkomponenten der FII-Fraktion nach 25%- und 50%-iger Methanolfällung wurden die Präzipitate und Überstände gelelektrophoretisch getrennt. Die Gelspuren in Abb. 3.14a) und die entsprechenden Densitogramme in Abb. 3.14 b) machen deutlich, daß das Verhältnis der M_r 19k- zur 14k-Proteinbande in dem methanolgelösten Proteinanteil (55% : 42%) unabhängig von der Methanolkonzentration nahezu konstant und vergleichbar mit dem Verhältnis in der F II-Probe bleibt (Kapitel 3.2.6).

Im nachweislich noch kanalaktiven 25%-igen Methanol-Pellet präzipitierten ca. 11.4% des gesamten Proteins mit einem analogen Proteinmuster.

Der Proteinanteil (7%) im 50%-igen Methanol-Präzipitat weist dagegen ungefähr ein Verhältnis von 1 : 1 der 19k- zur 14k-Komponente auf, Kanalaktivität konnte in diesem Präzipitat - wie oben erwähnt - nicht nachgewiesen werden.

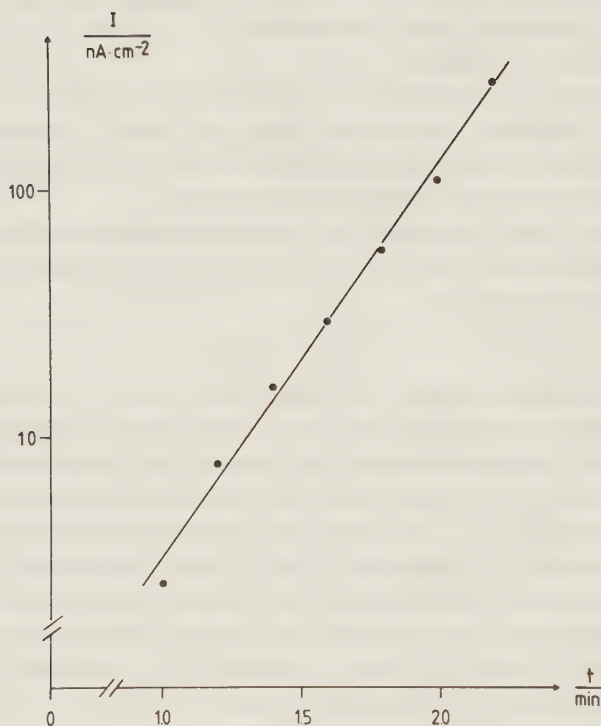


Abb. 3.13: Halblogarithmische Darstellung der Stromzunahme in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation des 50%-igen Methanolüberstandes (FII, MeOH 50%)

Um die exponentielle Membranstromzunahme in Abhängigkeit von der Zeit durch die 50% methanolgelöste, kanalbildende Komponente quantifizieren zu können, wurde die Stromzunahme in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Der Membranstrom in den entsprechenden Zeitintervallen kann direkt aus der Einbaukurve (Abb. 3.12 c)) abgelesen und auf die Membranfläche normiert werden. Aus der Steigung der Geraden kann die Zeitkonstante τ ermittelt werden. Sie definiert den Zeitraum, in dem bei einer Proteinkonzentration von $2.8 \mu\text{g/ml}$ der Membranstrom I auf das e -fache angestiegen ist. τ beträgt in diesem Fall 0.3 Minuten.

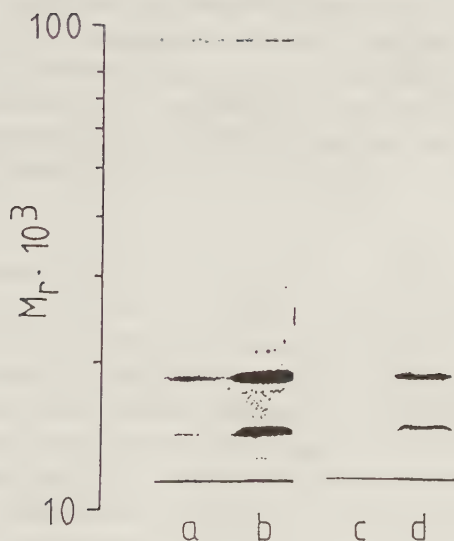


Abb. 314 a): Gelelektrophoretische Darstellung der Überstands- und Pelletproben nach 25%-iger und 50%-iger Methanolfällung der FII-Probe

Aliquote der Überstands- und Pelletproben nach 25%-iger und 50%-iger Methanolfällung wurden auf einem 15%-SDS-Gel getrennt, und das Gel im Anschluß an die Elektrophorese mit Coomassie auf Protein gefärbt. Die Bestimmung der relativen molaren Massen (M_r) erfolgte mit Hilfe der Markerproteine BSA, GAPD und Cytochrom.

a) FII, P25 (5 μ g)

b) FII, U25 (10 μ g)

c) FII, P50 (≤ 1 μ g)

d) FII, U50 (7,5 μ g)

Aufgrund der geringen Beladungsmenge ist der Proteinanteil in c) nur sehr wenig mit Coomassie anfärbbar und kann fotografisch nicht wiedergegeben werden.

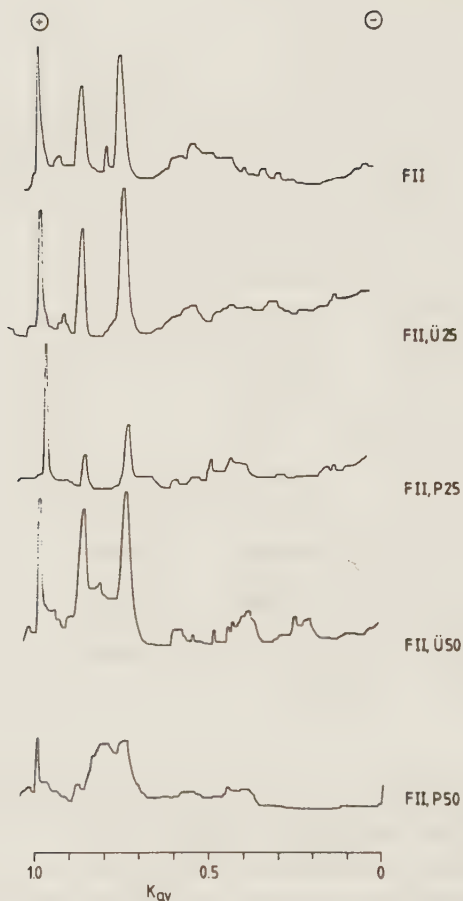


Abb. 3.14 b): Densitogramme der Überstands- und Pelletproben nach 25%-iger und 50%-iger Methanolfällung im Vergleich zur FII-Poolfraktion

Zur densitometrischen Aufzeichnung wurden die Geispuren a, b, c und d (Abb. 3.12 a) im Vergleich zu einem elektrophoretisch getrennten Aliquot (8 µg) der FII-Poolfraktion in einem Eppendorf-Photometer (Pherogramm-Auswerter 2602) bei einer Wellenlänge von 546 nm "gescannt". Die Densitogramme wurden auf einem Eppendorf-Kompensationsschreiber 4410 (Registrierbereich 0 - 1.0 Extinktion) registriert. Die relativen Mobilitäten (K_{av}) der Proteinbanden wurden nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\text{rel. Mobilität} = \frac{\text{Strecke der Protein-Wanderung}}{\text{Strecke der Farbstoff-Wanderung}}$$

Die ursprünglich zur Isolierung der kanalaktiven Substanz vorgesehene methanolische Extraktion aus *Amanita*-Pilzen kann den aufgezeigten Ergebnissen nach nicht ohne Verlust an spezifischer Kanaleinbaurate eingesetzt werden, da auch bei kurzer Kontamination mit dem organischen Lösungsmittel ein denaturierender Effekt nicht auszuschließen ist. Außerdem zeigte sich, daß die Haltbarkeit des methanolgelösten Proteinanteils auch nach Dialyse auf ca. zwei Tage (im Vergleich zu Monaten nach Ammoniumsulfatfällung) reduziert wird. Zur präparativen Gewinnung des Phalloporins ist eine methanolische Präzipitation daher nicht geeignet.

3.2.7.2 Phallolysin

Im Vergleich zum kanalbildenden Phalloporin kann bei der methanolischen Fällung der hämolytisch aktiveren FIV-Poolfraktion aus der präparativen Gelfiltration ein vollkommen anderes Verhalten gegenüber dem organischen Lösungsmittel registriert werden. Die gelelektrophoretische Trennung weist eine unterschiedliche Verteilung der Proteinanteile in den Überständen und den Präzipitaten nach der 25%- bzw. 50%-igen Methanol-Fällung auf (Abb. 3.15 a)). In beiden Überstandsproben ist das M_r 34k-Protein als Hauptproteinbande zu identifizieren. In den Präzipitaten dagegen tritt dieses Protein als Nebenbande auf, dafür macht hier die Hauptkomponente des aufgetragenen Proteins die 26k-Proteinbande aus.

Aus dem Densitogramm (Abb. 3.15 b)) kann für die 50%-ige Methanolfällung im Überstand (FIV, Ü 50) ein Verhältnis der Proteinanteile (26k/34k) 23.5% : 46.6% ermittelt werden. Reziprok dazu verhalten sich im Präzipitat (FIV, P 50) die Proteinanteile der beiden Komponenten (26k/34k) 41% : 9%.

Die extrem veränderte Proteinverteilung nach der methanolischen Fällung mit einer Endkonzentration von 50% im Überstand und im Pellet spiegelt sich ebenfalls in der Verteilung der Hämolyseaktivitäten wieder.

Die spezifische Hämolyseaktivität beträgt im Protein-Pellet nach 50% iger Methanolfällung 1182 H.E./mg und im Überstand 47.5 H.E./mg, im Vergleich zum Ausgangsmaterial FIV mit 500 H.E./mg. Dies bedeutet, daß eher die M_r 26k-Komponente und nicht die 34k-Komponente die hämolyisierenden Eigenschaften des Phalloporins besitzt.

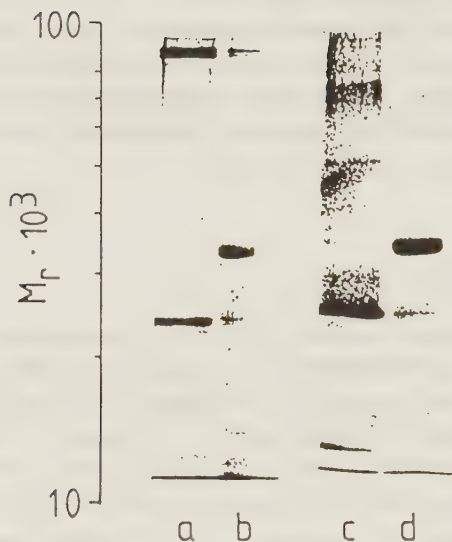


Abb. 3.15 a): Gelelektrophoretische Darstellung der Überstands- und Pelletproben nach 25%-iger und 50%-iger Methanolfällung der FIV-Poolfraktion

Die methanolische Fällung mit 25% und 50% Endkonzentration Methanol wurde - wie unter Abb. 3.12 beschrieben - durchgeführt. Die Proteinanteile in den Überstands- und Pelletproben wurden daraufhin auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt, und die Gele mit Coomassie gefärbt.

- a) FIV, P25 (10 µg)
- b) FIV, Ü25 (5 µg)
- c) FIV, P50 (12 µg)
- d) FIV, Ü50 (12 µg)

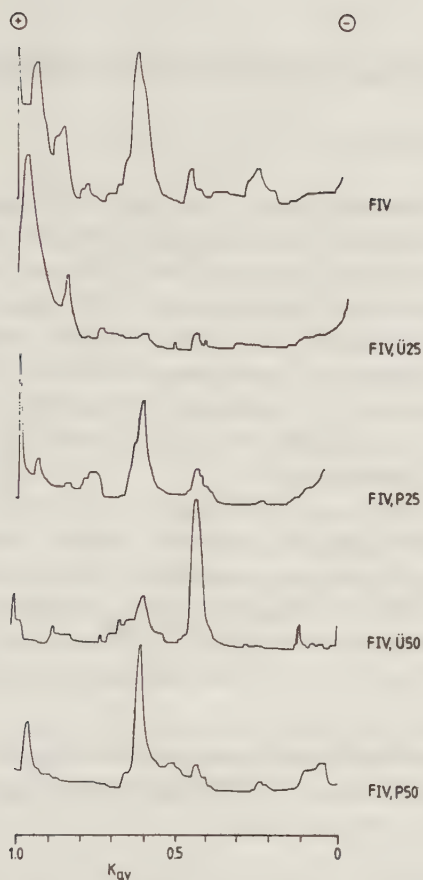


Abb. 315 b): Densitogramme der Überstands- und Pelletproben nach Methanolfällung im Vergleich zur FIV-Poolfraktion

Die Gelelecken a, b, c und d (Abb. 315 a)) wurden densitometrisch aufgezeichnet, wie unter Abb. 314 b) beschrieben. Als Vergleichsspur diente ein Aliquot (10 μ g) der FIV-Poolfraktion.

3.3 Analytische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung des Phalloporins

3.3.1 Analytische Gelfiltration

Zur Molmassenbestimmung wurde eine ammoniumsulfatgefällte Probe eines V_2 -Extraktes - wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben - über eine kalibrierte Säule gelfiltriert. In Abb. 3.16 a) ist das Elutionsprofil der im Vergleich zur präparativen wesentlich kürzeren analytischen Säule dargestellt. Die Klammern am oberen Bildrand markieren die auf Hämolyse und Kanalaktivität analysierten Proteinfractionen.

Die Verteilung der spezifischen Kanaleinbauraten bzw. Hämolyseaktivitäten auf die Fraktionen ist in Abb. 3.16 b) veranschaulicht. Im eingefügten Gelbild der entsprechenden Fraktionen können in der kanalaktivsten Fraktion 10 u. a. die M_r 19k- und 14k-Proteinbanden identifiziert werden.

Die analytische Gelfiltration wurde im Vergleich zur präparativen Gelfiltration zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt durchgeführt, dies erklärt, warum die maximal erreichte spezifische Einbaurate in der kanalaktivsten Fraktion 10 im Vergleich zur FII-Probe der präparativen Chromatographie wesentlich niedriger liegt. Außerdem zeigt das gelektrophoretische Bild der Fraktion 10, daß neben den bekannten 19k- und 14k-Proteinen hier hauptsächlich eine 64k-Proteinkomponente miteluiert.

Die Hämolyseaktivität ist in den Fraktionen 24, 36 und 44 mit dem Vorhandensein insbesondere der M_r 26k-Proteinbande korreliert, die ebenfalls als eine der beiden Hauptbanden in der hämolytisch aktivsten FIV-Fraktion der präparativen Gelfiltration identifiziert werden konnte (Kapitel 3.2.6).

Durch die Kalibrierung der Säule und die Berechnung der Verteilungskoeffizienten (K_{av}) nach Kapitel 2.2.4 können die Elutionspositionen der kanal- und hämolytisch aktivsten Proteinfractionen (10, 24) bestimmt und anhand der Eichkurve (Abb. 3.16 c)) einer dementsprechenden relativen molaren Masse zugeordnet werden. Für die kanalbildende Komponente ermittelt sich unter den gegebenen Bedingungen eine M_r von 250k - 220k, die Hämolyseaktivität ist hauptsächlich mit einer 40k- - 50k-Komponente assoziiert.

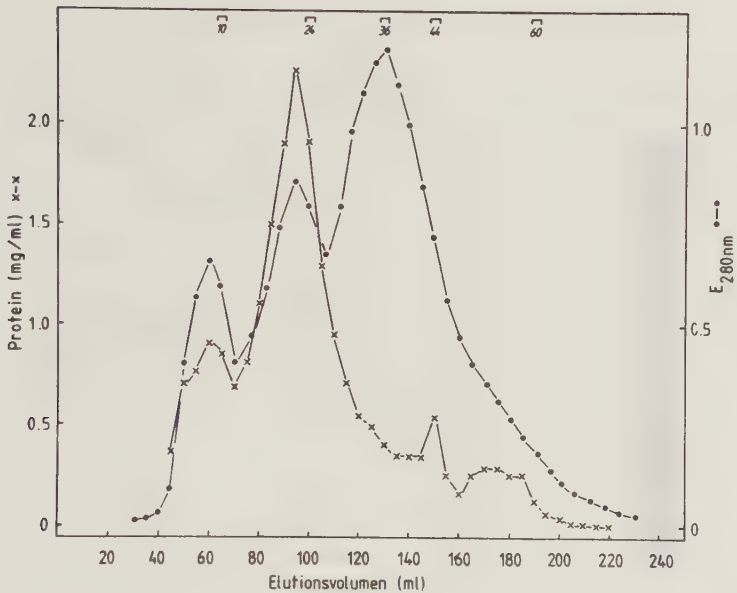


Abb. 316 a): Analytische Gelfiltration des ammoniumsulfatgefällten V₂-Extraktes

Die Durchführung der analytischen Gelfiltration auf einer Sephacryl S-300-Säule (2 x 80 cm) wird in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Es wurden ca. 96 mg Protein aufgetragen, mit einem Puffer aus 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.0 eluiert und bei einer Wellenlänge von 280 nm registriert. Die Proteinausbeute - nach Lowry et al. in jeder zweiten Fraktion bestimmt - betrug 93%.

Die Klammern am oberen Bildrand markieren die Peakfraktionen, die auf Hämolyseaktivität und Kanaleinbautraten hin untersucht wurden.

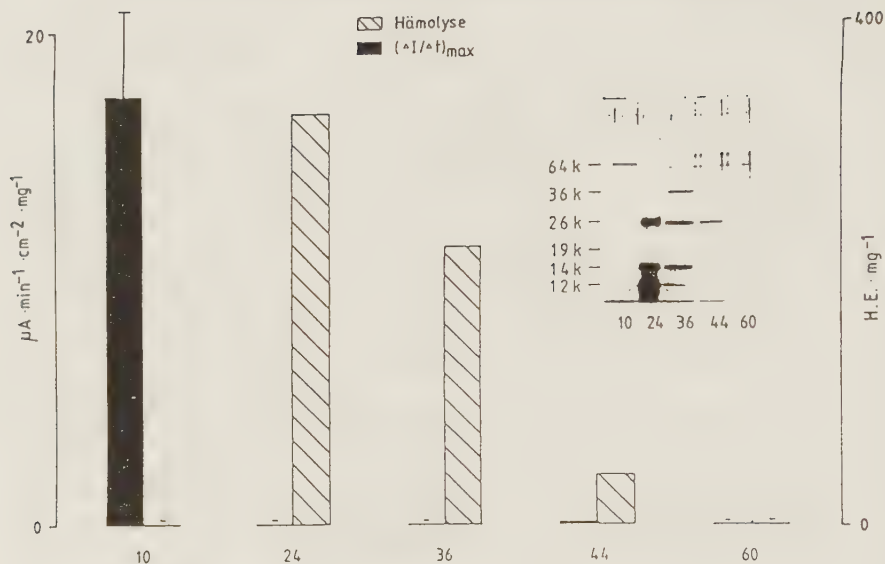


Abb. 3.16 b): Die Verteilung der spezifischen Hämolysseaktivitäten und Kanaleinbauraten in den Peakfraktionen der analytischen Gelfiltration

Die spezifischen Hämolysseaktivitäten und Kanaleinbauraten in den Peakfraktionen 10, 24, 36, 44 und 60 (s. Abb. 3.16 a)) wurden - wie unter Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.2.1.4 beschrieben - bestimmt. Zur Identifizierung der Proteinanteile in den Peakfraktionen erfolgte eine SDS-PAGE nach Kapitel 2.2.5 (s. eingefügtes Gelbild). Die Minuszeichen bei Fraktionen 10, 24, 36 und 60 deuten an, daß hier keine Hämolysseaktivität bzw. Kanaleinbaurate gemessen werden konnte. Die spez. Kanaleinbaurate in der Fraktion 10 wurde aus den Ergebnissen von fünf Bilayerexperimenten ermittelt. Alle anderen Daten stellen Mittelwerte aus je zwei Messungen dar.

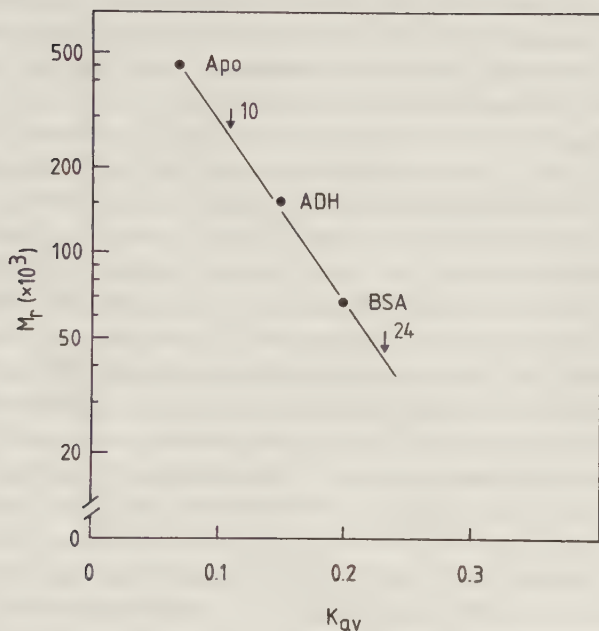


Abb. 316 a): Eichkurve zur analytischen Gelfiltration

Die Durchführung und die Berechnung der Verteilungskoeffizienten (K_{av}) sind in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Die Pfeile markieren die Elutionspositionen der kanalaktivsten (10) und hämolytisch aktivsten (24) Proteinfractionen. Die zur Kalibrierung verwendeten Proteine waren Apoferritin (Apo), Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) und Rinderserumalbumin (BSA).

3.3.2 Native Gelelektrophorese

Die empirische Molmassenbestimmung mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese hat den entscheidenden Nachteil, daß die Denaturierung der Proteinkomplexe in Anwesenheit des ionischen Detergenz Na-dodecylsulfat keine Aussagen über die Komplexität und molekulare Größe des nativen Proteins zuläßt.

Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung der relativen molaren Masse des nativen Phalloporin- bzw. Phallolysinkomplexes Proben der FII- und FIV-Poolfraktionen auf einem nicht-denaturierenden Gelsystem nach Kühn et al. (1980) getrennt.

Kühn et al. entwickelten eine lineare Gradientengelelektrophorese in Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenz Triton X-100. Dieses Detergenz ermöglichte bei einer Reihe von Membranproteinen die Extraktion des nativen Proteinkomplexes ohne Verlust der biologischen Aktivität (Tanford und Reynolds, 1976). Markerproteine mit bekannten Molmassen wurden von Kühn et al. in ihrem Wanderungsverhalten in dem nativen Gelsystem untersucht. Bei doppeltlogarithmischer Auftragung der M_r -Werte der Standardproteine in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration erhält man in diesem Gelsystem eine lineare Beziehung für ein 5 - 20%-iges lineares Gradientengel (Kühn et al., 1980). Aliquote der FII- bzw. der FIV-Poolfraktionen und Standardproteine bekannter Molmassen wurden auf einem 5 - 25%-igen Gradientengel nach der genannten Methode aufgetrennt. Die Eichkurve für die verwendeten Standardproteine ist in Abb. 3.17 zu sehen. Die Datenpunkte lassen sich bei doppeltlogarithmischer Auftragung der relativen molaren Masse M_r gegen den Acrylamidgradienten mit guter Näherung (Korrelationskoeffizient 0.99) durch eine Gerade in Beziehung setzen.

Die entsprechenden Gelspuren der FII- bzw. FIV-Proben sind in den oberen Bildteilen der Abb. 3.18 wiedergegeben. Die hämolytisch aktivere FIV-Fraktion trennt sich in fünf Proteinbanden auf, deren Molmassen verglichen mit den Eichproteinen von 240 kD - 54 kD reichen. Am intensivsten färbte dabei die Bande mit 240 kD.

Die gelelektrophoretische Trennung des FII-Proteinkomplexes unter nativen Bedingungen erwies sich dagegen problematischer. Bei einer Endkonzentration von 0.1% (w/v) Triton X-100 im Proben- und Elektrodenpuffer erfolgte kein Einwandern des Proteinmaterials ins Gel. Erst bei Erhöhung der Triton X-100-Konzentration auf 0.25% (w/v) konnte ein Eindringen des Proteinmaterials und eine unvollständige Trennung der Proteinanteile, begleitet von einer starken "Verschmierung" der Proteinbanden, erzielt werden (Abb. 3.18). Der Hauptanteil des FII-Proteinmaterials ist offenbar in sehr gerin-

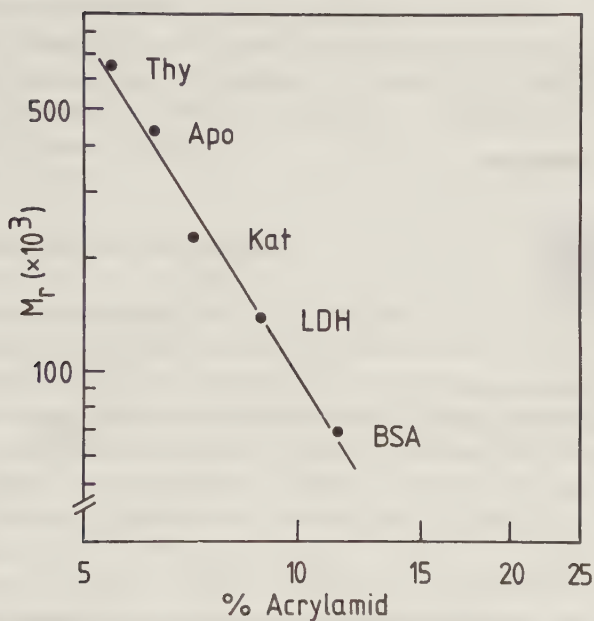


Abb. 317: Eichkurve zur nativen Gradientengelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese nach Kühn et al. (1980) in einem 5 - 25%-igen Gradientengel wurde in Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 - wie unter Kapitel 2.2.6 beschrieben - durchgeführt. Als Markerproteine dienen Thyroglobulin (Thy), Apoferritin (Apo), Katalase (Kat), Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Rinder-serumalbumin (BSA).

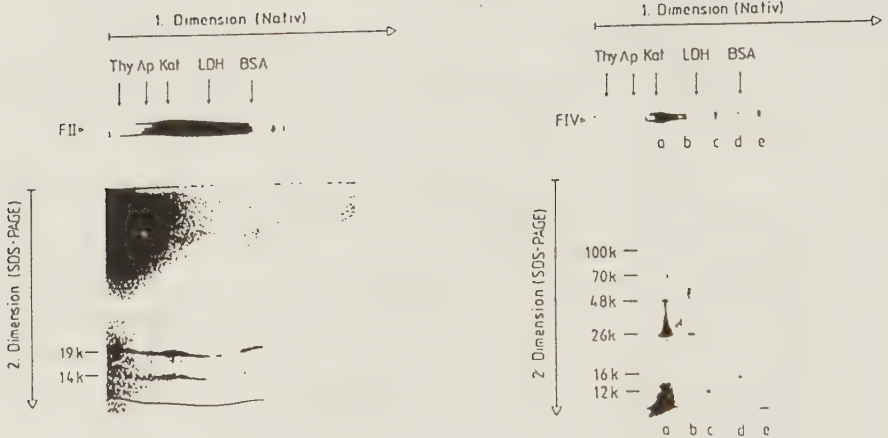


Abb. 318: Zweidimensionale Gelelektrophorese der FII- und FIV-Poolfraktion aus der Sephacryl S-300-Säule

In der ersten Dimension wurden je 15 µg der Proteinproben FII und FIV in einer nativen Gradientengelelektrophorese nach Kühn et al. (1980) aufgetrennt. Die Pfeile markieren die Positionen der Markerproteine Thyroglobulin (M_r 660k), Apoferritin (440k), Katalase (232k), Lactat-Dehydrogenase (140k) und Rinderserumalbumin (67k). Mit a, b, c, d und e sind die eindeutig zu identifizierenden Proteinbanden der FIV-Proteinprobe nach elektrophoretischer Trennung in der ersten Dimension bezeichnet. Sie werden einzeln aus dem Gel herauspräpariert und auf das SDS-Gel der zweiten Dimension übertragen. Im Falle der FII-Proteinprobe wurde aufgrund der "Verschmierung" der Proteinbanden im höhermolekularen Gelbereich der ersten Dimension der gesamte Gelstreifen der FII-Probe auf das SDS-Gel aufgelegt. Die Gele der ersten und zweiten Dimension wurden mit Coomassie auf Protein gefärbt.

gem Maß dissoziierbar durch das nicht-ionische Detergenz. Das ermöglicht die spontane Reaggregation der Proteinkomplexe im Verlauf der Elektrophorese, was in einer "Verschmierung" der Bande im oberen Gelabschnitt resultiert.

Die konkrete Angabe eines M_r -Wertes für den nativen Proteinkomplex des Phalloporins kann daher mit diesem Gelsystem nicht erfolgen. In Anwesenheit von 0,25% Triton X-100 liegen mit großer Wahrscheinlichkeit Proteinaggregate mit Molmassen zwischen M_r 70 kD und 250 kD vor.

3.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Homogenität der Proteinbanden aus der nativen Gelelektrophorese wurde im Anschluß an die Trennung in Anwesenheit von Triton X-100 (1. Dimension) eine SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (2. Dimension) durchgeführt.

Im Falle der FII-Proteinprobe konnten aufgrund der kontinuierlich angefärbten Gelspur im oberen Gelabschnitt keine Einzelbanden identifiziert und ausgeschnitten auf die 2. Dimension übertragen werden. Deshalb wurde hier die Gelspur in ihrer gesamten Länge auf der Oberkante des SDS-Gels fixiert und derart einer Elektrophorese unterzogen.

Die aufgetrennten Banden (a, b, c, d, e) aus der nativen Gelelektrophorese der FIV-Poolfraktion erlaubten eine Auftragung der einzelnen Proteinbanden in die Probentaschen des Laemmli-Gels.

Auf der Abb. 3.18 sind die entsprechenden Gel-Bilder der 1. und 2. Dimension veranschaulicht.

In der 2. Dimension können im Falle der FII-Proteinprobe ausschließlich die schon an anderer Stelle erwähnten M_r 19k- und 14k-Proteinbanden wiedergefunden werden. Hervorzuheben ist, daß trotz der unvollständigen Trennung unter nativen Bedingungen jetzt eine deutlich intensivere Färbung durch die 19k-Bande in drei Bereichen des 15%-igen SDS-Gels zu beobachten ist. Sie resultiert aus den entsprechenden Gel-Abschnitten des nativen Gels mit den ungefähren Molmassen von 240 kD - 200 kD, 80 kD - 60 kD und 40 kD - 30 kD und läßt eine Oligomerisierung des Proteinmonomers (19k-Protein) in wäßriger Lösung vermuten.

Die FIV-Poolfraktion zeigt sich nach der zweidimensionalen Trennung wesentlich komplexer in ihren Proteinanteilen. Der M_r 240k-Bande aus der nativen Gelelektrophorese lassen sich im SDS-Gel mindestens vier Banden zuordnen, wobei die 26k-Proteinkomponente die Hauptbande darstellt.

Die 160k-Proteinbande der 1. Dimension besteht nur aus einer Proteinkomponenten, die auf SDS-Gelen entsprechend einer Molmasse von M_r 26k wandert. Aus der 98k-Bande entsteht in der SDS-Gelelektrophorese hauptsächlich das 12k-Protein, während die 68k-Proteinbande unter denaturierenden Bedingungen mit einer Molmasse von M_r 16k vorliegt. Das 54k-Protein wird in Anwesenheit von SDS vollständig degradiert.

3.4 Präparative Gelelektrophorese zur Identifizierung des Phalloporins

Die Kanaleinbauten einer Phalloporinprobe blieben in Vorversuchen nach Inkubation mit Mercaptoäthanol (2.5%, 1 Stunde Raumtemperatur) und SDS (0.1%, 1 Stunde Raumtemperatur) und anschließender Dialyse bis zu 80% ihres Ausgangswertes erhalten.

Damit ist die Möglichkeit gegeben, die 19k- und die 14k-Proteinbande der aufgereinigten Phalloporinfraktion FII nach SDS-gelelektrophoretischer Trennung einzeln aus dem Gel zu eluieren und an künstlichen Lipidmembranen auf Kanalaktivität zu untersuchen. Voraussetzung zur Durchführbarkeit der Bilayertests allerdings ist eine hohe Proteinendkonzentration nach der Elution und Dialyse, damit das eingesetzte Probenvolumen auf ein Minimum (5 μ l) reduziert werden kann. Dies ist notwendig, da auch nach sorgfältiger Dialyse die Detergenzrückstände im Dialysat bei größeren Volumina die Stabilität der künstlichen Lipidbilayer drastisch herabsetzen.

In Abb. 3.19 a) sind die Referenzspuren der Bilayertests nach Applikation der eluierten M_r 19k- bzw. 14k-Bande gezeigt. Nach Zugabe der 19k-Proteinkomponenten kann der Einbau einzelner Ionenkanäle in die Lipiddoppelschicht in Form diskreter Stromstufen registriert werden. Appliziert man eine analoge Proteinmenge des 14k-Proteins, bleibt ein Einbau von Phalloporinkanälen aus. Das erhöhte Stromrauschen ist auf die in den Bilayern diffundierenden Detergenzmoleküle zurückzuführen. Die Kanalaktivität des Phalloporins läßt sich also allein mit der aufgereinigten 19k-Proteinkomponenten rekonstituieren.

Zur Überprüfung der Stabilität der eluierten 19k-Proteinbande wurde diese erneut auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung 3.19 b) zeigt, daß hier noch ein sehr geringer Anteil des aufgereinigten Proteins als 19k-Bande vorliegt. Der Hauptanteil ist in der 14k-Proteinbande wiederzufinden. Dies erklärt zum einen die relativ geringe Kanalaktivität nach Elution der 19k-Bande (Abb. 3.19 a), zum anderen bestätigt es die Vermutung, daß die 14k-Proteinbande als Degradationsprodukt der 19k-Bande angesehen werden kann.

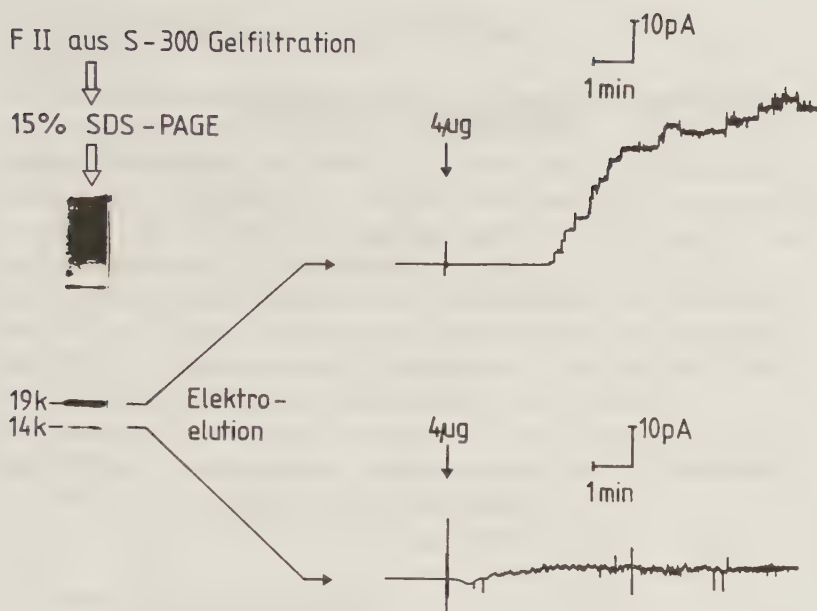


Abb. 319 a): Präparative SDS-PAGE zur Rekonstitution der Kanalaktivität

Ein Aliquot (50 µg) der FII-Poolfraktion wurde einer SDS-PAGE auf einem 15%-igen Gel unterzogen. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-Elektrophorese wurde die Proteinprobe im Probenpuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die stärkere Anfärbung im oberen Gelabschnitt ist aufgrund der hohen Proteinbeladung und des fehlenden Erhitzens auf 100°C auf undissoziiertes Proteinmaterial zurückzuführen. Die 19k- und die 14k-Proteinbanden wurden anschließend einzeln aus dem Gel elektro-eluiert und mindestens zwölf Stunden elektrodialysiert (Kapitel 2.1.6). Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Markwell et al. (1978) durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen der Bilayerversuche sind wie unter Abb. 3.5 beschrieben. Die Proteinendkonzentration nach Zugabe von je 4 µg Protein entspricht 1.08 µg/ml.

19k-Bande aus SDS-Gel



15% SDS-Gel

19k-- -
14k-- ◆
!

Abb. 319 b): SDS-PAGE der eluierten 19k-Proteinbande

Nach der Elution aus dem 15%-igen SDS-Gel wird die elektrodialysierte 19k-Proteinbande erneut einer SDS-Gelelektrophorese (nach Kapitel 2.2.5) unterzogen. Im Gegensatz zu den im Kapitel 2.2.5 beschriebenen Flachgeleigrößen erfolgte die elektrophoretische Trennung auf einem 80 × 100 mm Flachgel mit einer Stärke von 0.4 mm. Die Beladungsmenge betrug 5 µg. Die Proteinbestimmung wurde nach Markwell et al. (1978) durchgeführt.

3.5 Isoelektrische Fokussierung der FII- und FIV-Probe

Die Abb. 3.20 zeigt schematisch das Proteinbandenmuster nach isoelektrischer Fokussierung der FII- und FIV-Poolfraktion aus der S-300-Säule.

In dem FII-Aliquot lassen sich, analog zu den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese, ausschließlich zwei Banden bei ca. pH 6.3 und 7.3 identifizieren, wobei das Protein mit dem sauren isoelektrischen Punkt (p.I.) intensiver gefärbt ist und den Hauptanteil des aufgetragenen Proteins darstellt.

Die in der SDS-Gelelektrophorese zu beobachtende Komplexität der Zusammensetzung der FIV-Fraktion wird nach isoelektrischer Fokussierung durch das Auftreten von mindestens drei Proteinhauptbanden mit isoelektrischen Punkten von bei ca. pH 8.3, 7.5 und 6.9 und einer schwachen Nebenbande bei ca. pH 6.7 bestätigt.

Der Hauptanteil der kanalaktiven Proteinprobe FII besteht damit aus neutralen bis schwach sauren Proteinkomponenten, während der größte Anteil der hämolytisch aktiven Probe FIV durch neutrale bis basische Proteine vertreten ist.

3.6 Verhalten gegenüber Proteaseabbaudung und Hitzebehandlung

In Anlehnung an die Untersuchungen der physiko-chemischen Eigenschaften des Phallolysins durch Seeger (1975) wurden aufgereinigte Phalloporinpräparate in ihrem Verhalten gegenüber unspezifischen Proteasen und Hitzebehandlung untersucht.

3.6.1 Proteasen

Weder nach 24- noch 48-stündiger Inkubation mit Proteinase K und Pronase E konnte unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen (Kap. 2.2.9) in der aufgereinigten Phalloporinpräparation FII ein Aktivitätsverlust des Kanalbildners registriert werden. Entsprechend dazu existieren nach gelelektrophoretischer Trennung der mit den Proteasen 48 Stunden inkubierten Proteinproben, wie Abb. 3.21 zeigt, unverändert auch in den Proteinanteilen die M_r 19k- und die 14k-Proteinbande. Nur die bei der Chromatographie mitelaufernde 64k-Nebenbande ist nach der Proteaseabbaudung vollkommen degradiert.

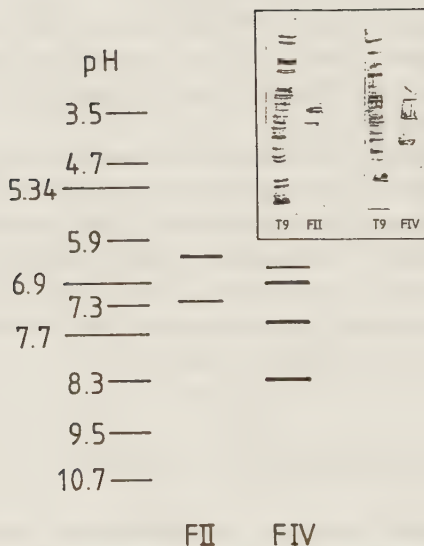


Abb. 320: Isoelektrische Fokussierung der FII- und FIV-Poolfraktionen

Die Abbildung zeigt schematisch das Proteinbandenmuster nach isoelektrischer Fokussierung der FII- bzw. FIV-Poolfraktion auf kommerziellen Ampholyt-Flachfolien (Servalyt-Precotes) mit einem pH-Gradienten von 3 - 10. Als Markerproteinmischung zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte dienten Aliquote einer Proteintestmischung (Serva Nr. 9). Im eingefügten Bild ist die isoelektrische Fokussierung im Original wiedergegeben. Aufgrund der geringen Auftragsmenge ($\leq 2 \mu\text{g}$) sind die Proteinbanden nach Coomassie-Färbung nur sehr schwach photographisch reproduzierbar. Neben den Proteinproben FII und FIV wurden $5 \mu\text{g}$ der Proteintestmischung (T 9) aufgetragen.

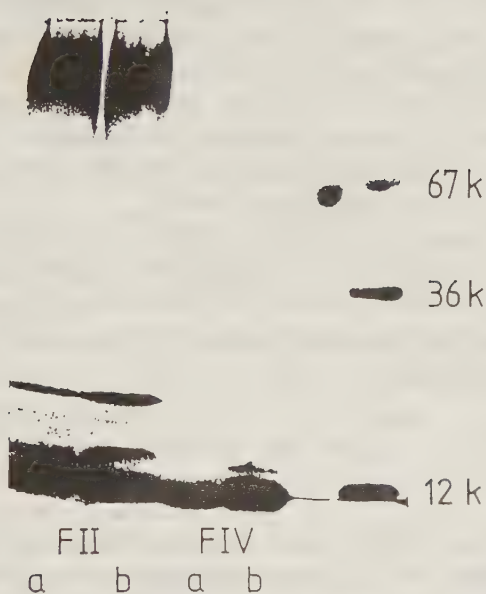


Abb. 321: Protease-Abdauung der FII und FIV-Poolfraktionen

Aliquote der Poolfraktionen FII und FIV aus der Sephacryl S-300-Gelfiltration wurden mit den unspezifischen Proteasen Proteinase K und Pronase E 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt.

F II (je 10 μ g): + Proteinase K (a), + Pronase E (b)

FIV (je 14 μ g): + Proteinase K (a), + Pronase E (b)

Als Markerproteine dienten Rinderserumalbumin, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Cytochrom C.

Die Resistenz des Kanalbildners gegenüber den Proteasen kann evtl. darauf zurückgeführt werden, daß die möglichen Angriffsstellen im nativen Phalloporinkanal zur Molekülinnenseite exponiert und damit für die Enzyme nicht zugänglich sind. Diese Vermutung wird bestätigt durch Vorversuche mit ammoniumsulfatgefällten Phalloporinpräparationen (hier nicht gezeigt), bei denen eine Proteinase K-Inkubation kein Verlust der Kanalaktivität zur Folge hatte, die Kombination der Proteaseabbaue mit gleichzeitiger Anwesenheit von 0.1% SDS führte jedoch schon nach zweistündiger Inkubationszeit zu einer vollständigen Inaktivierung des Phalloporins. Durch detergenteninduzierte Konformationsänderungen werden offenbar die entsprechenden Angriffsstellen für die Proteaseabbaue zugänglich gemacht.

Die anfängliche Hämolyseaktivität der FIV-Probe reduziert sich nach 24 Stunden Inkubation mit Pronase E auf 53%, nach einer Inkubationszeit von weiteren 24 Stunden ist in beiden Proben keine Hämolyseaktivität mehr nachzuweisen. Wie aus der Abb. 3.2 hervorgeht, werden die Proteine der FIV-Probe durch eine 48-stündige Protease-Abbaue fast vollständig degradiert.

3.6.2 Hitzedenaturierung

Das Hämolsin aus *Amanita phalloides* erwies sich nach Seeger et al. (1973) und Seeger (1975) als thermolabil: Nach 60 Minuten Inkubation bei einer Temperatur von 60°C konnten nur noch 6% der anfänglich eingesetzten Hämolyseaktivität gemessen werden. Auch die kanalbildende Komponente in ammoniumsulfatgefällten Proteinproben aus *Amanita phalloides* zeigte eine Empfindlichkeit gegenüber Hitzebehandlung. Zweiminütiges Erhitzen der Phalloporinproben (in 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4) auf 100°C führt zum vollständigen Aktivitätsverlust des Kanalbildners, auch nach Applikation sehr hoher Proteinkonzentrationen (5 µg/ml) bleibt die Membranleitfähigkeit auf dem Wert einer undotierten Lipidmembran.

Nach zwölfstündiger Inkubation einer Phalloporinprobe bei 37°C kann eine Abnahme der spezifischen Kanaleinbaureate von 7.56 µA/min×cm²×mg auf 5.77 µA/min×cm²×mg beobachtet werden. Ein alterungsbedingter Aktivitätsverlust kann dafür erfahrungsgemäß ausgeschlossen werden, da sich eine einmal gelöste Phalloporinprobe bis zu einer Woche (bei 4°C) in ihrer spezifischen Einbaureate unverändert aufbewahren läßt. Bei Temperaturen, die eine fast vollständige Denaturierung des Hämolsins bewirken (Seeger, 1975), erkennt man im Falle des Kanalbildners Phalloporin anhand der Einbaukurve eine Modifikation des kanalbildenden Proteins durch Hitze- einwirkung.

In Abb. 3.22 b) ist die Originalregistrierung der Kanaleinbaukurve einer ammoniumsulfatgefällten Proteinprobe nach einer Stunde Inkubation bei 60°C im Vergleich zur Kanalinkorporation einer unbehandelten ammoniumsulfatgefällten Proteinprobe (Abb. 3.22 a)) bei identischem Proteineinsatz wiedergegeben.

Der lineare Zuwachs des Membranstromes nach Applikation der unbehandelten Proteinprobe (AS) kann bei entsprechend empfindlicher Stromamplitudenaufösung auf den aufeinanderfolgenden Einbau einzelner Ionenkanäle zurückgeführt werden. Nach der Inkubation bei 60°C ist zwar immer noch eine drastische Erhöhung der Membranleitfähigkeit nach Zugabe des Proteinmaterials (AS, 1 h 60°C) zu registrieren, diskrete Leitwertstufen einzelner sich öffnender Ionenkanäle können jedoch nicht mehr identifiziert werden. Darüberhinaus handelt es sich hier nicht um einen linearen Stromzuwachs mit der Zeit, sondern eher um einen exponentiellen Anstieg der Membranleitfähigkeit.

Eine analoge Modifikation des Kanaleinbauverhaltens konnte schon an anderer Stelle bei der Denaturierung durch das organische Lösungsmittel Methanol (Kap. 3.2.7.1) - für das Phalloporin festgestellt werden. In der Tat können die nach Hitzebehandlung des Phalloporins erhaltenen Datenpunkte bei entsprechender halblogarithmischer Auftragung des Membranstromes I in Abhängigkeit von der Zeit näherungsweise durch eine Geradengleichung beschrieben werden (Korrelationskoeffizient 0.98), was auf einen einfach exponentiellen Einbauprozess zurückzuführen ist (Abb. 3.22 c)). Als Kriterium zur quantitativen Beschreibung der veränderten Einbauaktivität kann wiederum die Zeitkonstante τ (Kapitel 3.2.7.1) aus der Geradensteigung herangezogen werden. Sie beträgt bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von $2.8 \mu\text{g/ml}$ 3.2 Minuten.

Da der makroskopischen Membranleitfähigkeitserhöhung nach Applikation des hitzebehandelten Phalloporins ein völlig veränderter Einbauprozess des Kanalbildners zugrundeliegt, kann kein prozentualer Verlust der spezifischen Kanaleinbaurrate infolge Hitzedenaturierung angegeben werden. Eine Interpretation der modifizierten Leitfähigkeitserhöhung wird in einem folgenden Kapitel zur Diskussion gestellt.

Wie im Fall des modifizierten Kanaleinbaus nach Methanol-Denaturierung ist auch nach Hitzebehandlung die Verzögerungszeit t_{lag} , der Zeitraum bis zum ersten Auftreten der Membranleitfähigkeitserhöhung trotz gleicher Proteinkonzentration reduziert.



Abb. 322 a): Einbaukurve einer ammoniumsulfatgefällten Proteinprobe aus *Amanita phalloides*

Nach Applikation (Pfeil) einer 25%-ig ammoniumsulfatgefällten Proteinprobe eines V_2 -Extraktes (AS) kann nach ca. drei Minuten der sukzessive Einbau einzelner Phalloporinkanäle bei hoher Stromauflösung registriert werden. Der Einzelkanalleitwert entspricht bei der angelegten Membranspannung 52 pS.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2-POPC, Cholesterol (9 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Membranspannung: + 50 mV

Proteinkonzentration: 2.8 $\mu\text{g/ml}$

b)

AS, 1h 60°C

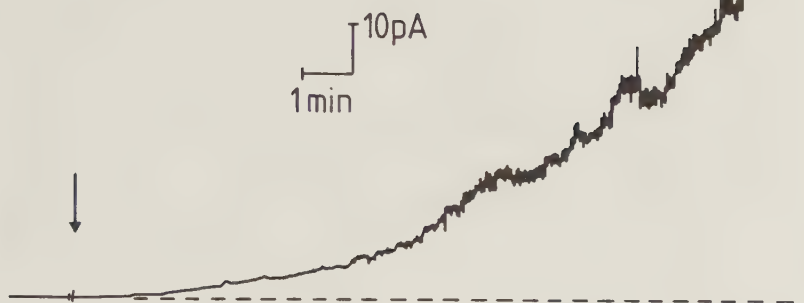


Abb. 3.22 b): Einbaukurve der ammoniumsulfatgefällten Probe (AS) nach Inkubation bei 60°C

Ein Aliquot der unter Abb. 3.22 a) beschriebenen Proteinprobe wurde eine Stunde bei 60°C inkubiert und anschließend auf Kanalinkorporation untersucht. Die experimentellen Bedingungen sind identisch mit denen unter Abb. 3.22 a). Nach Zugabe einer vergleichbaren Proteinmenge der hitzebehandelten Probe registriert man eine exponentielle Membranstromzunahme. Diskrete Einzelkanalfluktuationen können trotz gleichhoher Stromauflösung nicht mehr beobachtet werden. Neben einem zunehmenden Stromrauschen ist vor allem die reduzierte Verzögerungszeit bis zum ersten Ansteigen der Membranleitfähigkeit auffällig (siehe Diskussion).

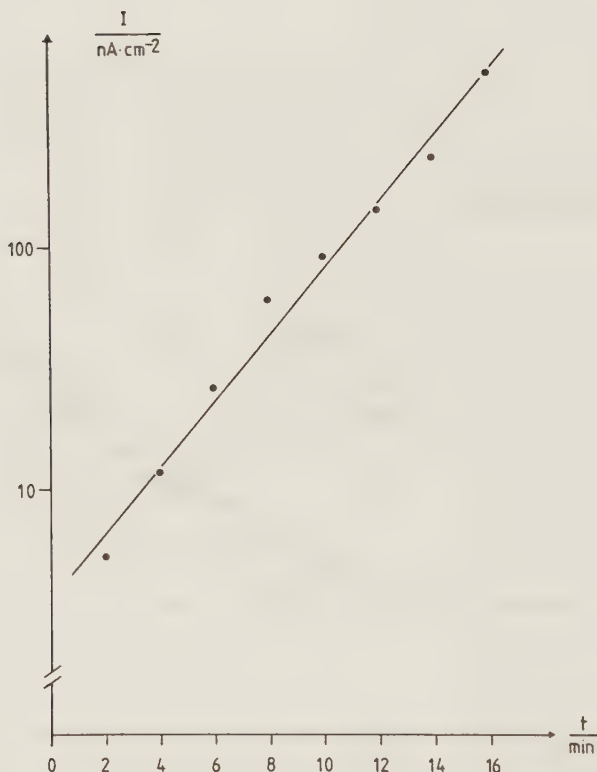


Abb. 3.22 c): Halblogarithmische Darstellung der Stromzunahme I in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der hitzebehandelten Phalloporinprobe

Die Membranstromzunahme I in entsprechenden Zeitintervallen kann direkt aus der Einbaukurve in Abb. 3.22 b) abgelesen und auf die Membranfläche normiert werden. Bei halblogarithmischer Auftragung der Membranstromzunahme gegen die Zeit erhält man mit relativ guter Näherung (Korrelationskoeffizient 0.98) eine Gerade.

4. Diskussion

4.1 Entdeckung des kanalbildenden Proteins Phalloporin in *Amanita phalloides*

Bei der Untersuchung des molekularen Mechanismus der cytolytischen Aktivität durch Phallolysin aus *Amanita phalloides* (Vaill. ex. Fr.) Secr. konnte dem Protein weder eine proteolytische noch eine lipolytische Enzymaktivität nachgewiesen werden (Seeger et al., 1976; Seitz et al., 1981). Darüberhinaus wurde auch eine Saponin-ähnliche Reaktion mit Cholesterol oder eine detergenzartige Wirkung auf Zellmembranen als mögliche Erklärung des Lyseprozesses ausgeschlossen (Seeger et al., 1976). Die kinetischen Messungen der Phallolysin-induzierten Cytolyse an Erythrozyten zeigten, daß der eigentlichen Lyse der Zelle eine Erhöhung der Membranpermeabilität für Kationen, vor allem Natrium- und Kalium-Ionen, vorausgeht (Seitz et al., 1981; Faulstich et al., 1983). Durch den erhöhten Einstrom von Natrium-Ionen in die Zelle und dem gleichzeitigen Leckstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle kann es durch Wassereintritt zur osmotischen Lyse der Zellen kommen (Seitz et al., 1981).

Diese Befunde unterstützten die Vorstellung, daß der zugrundeliegende cytolytische Wirkungsmechanismus auf die Ausbildung ionenpermeabler Membrankanäle zurückzuführen ist, wie es für eine Reihe von anderen cytolytischen Substanzen gezeigt werden konnte (Bernheimer 1974; Schein et al., 1978; Bühring et al. 1983; Faulstich et al., 1983; Menestrina, 1986).

Um diesen möglicherweise kanalbildenden Mechanismus des Phallolysin nachzuweisen, wurde die Wirkung des wasserlöslichen Proteins auf die Membranleitfähigkeit künstlicher planarer Lipidbilayer untersucht (Wilmsen, 1983; Wilmsen et al., 1985). In den elektrochemischen Experimenten konnte in der Tat - sowohl in den wäßrigen Extrakten des *Amanita*-Pilzes, als auch in teilweise aufgereinigten Proteinpräparationen mit hohen Anteilen an Phallolysin - ein kationenpermeabler, spannungs- und pH-abhängiger Ionenkanal nachgewiesen werden (Wilmsen et al., 1985), der u. a. aufgrund seiner Selektivität vor allem für monovalente Kationen die von Seitz et al. (1981) beobachteten Ionenfluxe bei der Hämolyse zu erklären vermochte. Man nahm daher an, daß die kanalbildende und die cytolytisch aktive Komponente aus den wäßrigen Extrakten des grünen Knollenblätterpilzes identisch sind mit dem als Phallolysin bezeichneten Hämolsin (Wilmsen et al., 1985).

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der überraschende Befund, daß in hochaufgereinigten Phallolysinpräparationen bei elektrochemischen Bilayeruntersuchungen nahezu keine Kanalaktivität mehr festgestellt werden konnte (Kapitel 3.1).

Ausgehend von der ersten Reinigungsstufe, bei der sowohl Hämolyse als auch noch Kanalaktivität nachzuweisen war, wurde daraufhin eine ammoniumsulfatgefällte Proteinprobe aus *Amanita*-Extrakten über Gelfiltration in Proteinfractionen unterschiedlicher Molmassen aufgetrennt (Kapitel 3.1.1). Da zum damaligen Zeitpunkt die Untersuchungen zum konzentrationsabhängigen Einbau der kanalbildenden Substanz in künstliche Membranen noch ausstanden, konnte die Kanaleinbaurrate in den einzelnen Fraktionen nur rein qualitativ durch die An- oder Abwesenheit von Ionenkanälen in den entsprechenden Bilayerexperimenten bestimmt werden (Kapitel 3.1.1). Der qualitative Nachweis von Hämolyseaktivität und Kanaleinbaurrate in den verschiedenen Proteinfractionen genügte jedoch, um zu zeigen, daß die Hämolyse und die Kanalbildung in unterschiedlichen Fraktionen wiederzufinden sind (Tabelle 3.1). Diese Diskrepanz kann nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung und Charakterisierung des kanalbildenden *Phalloporins* als ein vom hämolytisch aktiven *Phallolysin* unabhängiges Protein erklärt werden. Durch die Entwicklung des quantitativen Inkorporationstests und die Untersuchungen zur Extraktion und Isolation des Phalloporins aus *Amanita*-Pilzen gelang es, das wasserlösliche, kanalbildende Protein zu identifizieren und bis zu ca. 350-fach anzureichern.

4.2 Isolierung des kanalbildenden Proteins aus *Amanita phalloides*

Zur Ausarbeitung einer reproduzierbaren Isolierungsmethode für das kanalbildende Protein aus *A. phalloides* war von Nutzen, daß es in allen untersuchten Pilzchargen als wasserlösliches Protein zu finden ist und damit ohne eine entsprechende Solubilisation mit Detergenzien, deren minimale Rückstände die Bilayerexperimente extrem beeinflussen vermögen, aus dem Pilzmaterial extrahiert werden kann (Kapitel 3.2.4). Die subzelluläre Verteilung der Kanalaktivität indiziert eine wasserlösliche Cytosolkomponente in den *Amanita*-Pilzen (Kapitel 3.2.4). Aus der Aufreinigungstabelle (Tabelle 3.4) wird deutlich, daß der effektivste Schritt zur Aufreinigung des Phalloporins in der Sephacryl S-300-Gelfiltration eines ammoniumsulfatgefällten V_2 -Extraktes liegt. Dort wird etwa 350-fach bezüglich der Kanaleinbaurrate angereichert. Der Anteil des kanalbildenden Proteins am Gesamtprotein des wäßrigen Extraktes liegt den Ergeb-

nissen zufolge unter 0.3%. Das entspricht einer Ausbeute von ≤ 5 mg pro kg Pilzmaterial. Die Aufreinigung des Phalloporins über Zentrifugation und anschließender DEAE-Ionenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren führte im Vergleich zur Gelfiltration nur zu einer maximal 32-fachen Anreicherung des Proteins. Aufgrund des spontanen Einbaus des kanalbildenden Proteins in die hydrophobe Lipidmatrix lag die Vermutung nahe, daß das Phalloporin auch eine wesentlich hydrophobere Konformation annehmen kann und damit bis zu einem gewissen Grad in unpolaren Lösungsmitteln stabil bleibt.

Vom Hämolysin aus *Amanita phalloides* ist bekannt, daß es sich um ein alkohollabiles Protein handelt (Seeger, 1975); eine eventuell effektive Trennung des alkohollabilen Hämolysins von der alkoholstabilen kanalbildenden Komponente sollte somit durch eine methanolische Extraktion des Kanalbildners aus *Amanita*-Pilzen ermöglicht werden. Aus diesem Grund wurde eine aufgereinigte Phalloporinprobe im Vergleich zu einer Phallolysinprobe auf ihr Verhalten gegenüber dem organischen Lösungsmittel Methanol untersucht.

In der Tat läßt sich das kanalbildende Protein - im Gegensatz zum Hämolysin - unter Beibehaltung einer leitfähigkeitserhöhenden Aktivität an künstlichen Membranen in eine organische Phase überführen (Kapitel 3.2.7.1 und 3.2.7.2). Aufgrund des veränderten Einbauverhaltens des Phalloporins und der reduzierten Haltbarkeit, selbst nach Verdünnung und Dialyse der Proteinproben, schied die angestrebte Reinigungsprozedur des Kanalbildners über eine alkoholische Extraktion aus *Amanita*-Pilzen aus.

Erschwerend für die Ausarbeitung einer effektiven Isolierungsmethode des Phalloporins neben dem recht geringen Gehalt am Gesamtprotein kam hinzu, daß aufgrund der ungünstigen Witterungsverhältnisse die Frischpilzausbeuten in den Jahren 1986 und 1987 äußerst gering ausfielen und deshalb mit 2 - 3 Jahre altem, tiefgefrorenem Pilzmaterial gearbeitet werden mußte, das nachweislich einem alterungsbedingten Aktivitätsverlust unterlag. Dies erklärt auch die Tatsache, daß die gezeigten spezifischen Aktivitäten in gleichen Ausgangsmaterialien stark variieren können.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung des Phalloporins

Aus den Ergebnissen zur Isolierung und Aufreinigung der hämolytischen und kanalbildenden Komponenten kann die anfänglich postulierte Nicht-Identität der beiden Proteine bestätigt werden. Die Anreicherung des Kanalbildners über Gelfiltration führte zur Isolierung von zwei - auf SDS-Gelen zu identifizierenden - Proteinbanden mit

relativen molaren Massen von 19k und 14k, wobei die 19k-Proteinbande mit maximal 65% die Hauptkomponente darstellt (Kapitel 3.2.6). Aufgrund der Rekonstitutionsversuche mit den aus SDS-Gelen eluierten 19k- bzw. 14k-Proteinbanden (Kapitel 3.4) konnte die Kanalaktivität einzig mit dem 19k-Protein korreliert werden. Die 14k-Bande zeigte keine kanalbildenden Eigenschaften. Da in älteren aufgereinigten Proteinchargen (Kapitel 3.2.6) und in der eluierten 19k-Proteinbande nach einer weiteren Elektrophorese (Kapitel 3.4) der Anteil der 14k-Proteinbande zuungunsten der 19k-Proteinbande anstieg (Kapitel 3.2.6), liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei der niedermolekularen 14k-Proteinbande um ein alterungsbedingtes, abspaltbares, inaktives Degradationsprodukt des kanalbildenden 19k-Proteins handelt.

4.3.1 Aggregationsverhalten und Inkorporation

Wie schon aus den qualitativen Ergebnissen der Gelfiltration einer ammoniumsulfatgefällten Proteinprobe aus *A. phalloides* gefolgert werden konnte (Kapitel 3.1.1), liegt der Hauptanteil des Phalloporins unter nicht-denaturierenden Bedingungen als Proteinkomplex mit einer Molmasse ≥ 150 kD vor. In der analytischen Gelfiltration mit hochmolekularem Trennbereich ist die Kanalaktivität mit Proteinkomplexen zwischen 250k und 220k assoziiert. Eine mögliche Oligomerisierung der 19k-Polypeptidkette zu höhermolekularen Komplexen unter nativen Bedingungen wird ebenfalls durch die Gelelektrophorese mit Triton X-100 bekräftigt. Da die Anwesenheit von 0.1% Triton X-100 als Detergenz nur zu einer unvollständigen Dissoziation führt, kann gezeigt werden, daß drei Molmassenbereiche favorisiert werden (M_r 240k - 200k, M_r 80k - 60k, M_r 40k - 30k, (Kapitel 3.3.2)), die mit der Ausbildung von Dimeren, Tetrameren und Proteinaggregaten aus mindestens zehn identischen Polypeptidketten zu erklären sind.

Bei einer Reihe von wasserlöslichen, kanalbildenden Proteinen wird - ähnlich wie bei hochmolekularen, biologischen Membrankanälen - eine Selbstassoziation von Proteinmonomeren zur Ausbildung der Kanalstruktur diskutiert. So ist die Inkorporation in den Lipidbilayer beim *Staphylococcus*- α -Toxin und beim C5b-C9(m)-Komplexsystem der Immunabwehr abhängig von einer vorausgehenden Molekülaggregation. Im aggregierten Zustand können beide Proteine vorher im Molekülinneren verborgene, apolare Reste exponieren, so daß der Übertritt in den Lipidbilayer energetisch begünstigt wird (Mayer, 1972; Bhakdi und Tranum-Jensen, 1978). Beim *Staphylococcus*- α -Toxin konnte die Entstehung der Ionenkanäle durch die Ausbildung von hexameren Proteinkomplexen aus identischen Proteinmonomeren von M_r 34k erklärt werden (Bern-

heimer, 1974; Menestrina, 1986). Genau wie beim Phalloporin ist die Erhöhung der Leitfähigkeit künstlicher Lipidmembranen nach Applikation des α -Toxins auf den Einbau von Ionenkanälen mit einer konstanten Leitwertstufe zurückführbar.

Allerdings handelt es sich beim Ionenkanal aus *Staphylococcus aureus* um einen unselektiven Kanal mit - im Vergleich zum Phalloporinkanal - sehr hohem Leitwert (450 pS in 0.5 M KCl; Menestrina, 1986). Im Gegensatz zum linear konzentrationsabhängigen Phalloporineinbau nimmt die Kanaleinbaurrate nach Applikation des α -Toxins mit dem Quadrat der Proteinkonzentration zu, was formal den zur Ausbildung der Kanäle vorausgesetzten Oligomerisationsprozeß bestätigt (Belmonte et al., 1986).

Eine Assoziation der Kanaluntereinheiten ist bei einigen Proteinen nicht nur für die Einlagerung des Proteins in die Membran selbst - wie für die Beispiele des α -Toxins und des Proteinkomplexes der Immunabwehr gezeigt - notwendig, sondern auch für die eigentliche Kanalbildung in der Membran.

Die Antibiotika Gramicidin und Alamethicin sowie das Bienengift Melittin sind gut untersuchte Beispiele für Kanalstrukturen, die erst nach einer Aggregation ihrer Monomeren innerhalb der Membran zur Ausbildung leitender Ionenkanäle befähigt sind (Bamberg und Läger, 1974; Boheim et al., 1983; Hanke et al., 1983). Neben der im Vergleich zum Phalloporin stärkeren Konzentrationsabhängigkeit der Kanalbildung weisen das Alamethicin und das Melittin zusätzlich im Einzelkanalverhalten ein Fluktuationsschema mit einer Sequenz mehrerer nicht-integraler Leitwertstufen auf, die die verschiedenen Aggregatzustände der Kanalstrukturen widerspiegeln. Zu diesem Typus wasserlöslicher Kanalbildner ist auch das an anderer Stelle näher beschriebene Rubescensporin (4.3.3) aus *A. rubescens* zu zählen.

Sowohl für das von Menestrina et al. (1987) untersuchte kanalbildende *E. coli*-Hämolysin (Kapitel 1.3.1), als auch das kanalaktive Colicin E_1 (Peterson und Cramer, 1987a) und b) und das tryptische C-terminale Peptid des Colicins E_1 (Bullock et al., 1983; Davidson et al., 1985) wird für die Kanalaktivität aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit und des einheitlichen Einzelkanalleitwertes eine fixierte, monomere Kanalstruktur vorgeschlagen.

Wie aus den Daten des Inkorporationsverhaltens des Phalloporins hervorgeht, handelt es sich bei den Phalloporinkanälen um einheitlich strukturierte Komplexe, die nach ihrer Inkorporation unabhängig voneinander funktionieren. Die lineare Beziehung der maximalen Einbaurrate in Abhängigkeit von der Phalloporinkonzentration und die einheitliche Leitwertstufe der Einzelkanäle (52 pS in 1 M NaCl-Lösung) implizieren einen Kanaleinbau des Phalloporins in der Art des *E. coli*-Hämolysins und des E_1 -Colicins (Kapitel 1.3.2).

Wegen der fixierten Struktur des Phalloporinkanals finden die unter nicht-dissoziierenden Bedingungen auftretenden Oligomerisationsprozesse des wassergelösten Proteins damit in den Bilayertests keine Entsprechung im Einzel- und Vielkanalverhalten des inkorporierten Phalloporins und sind damit nicht unbedingt in Zusammenhang mit dem Kanalbildungsmechanismus in der Membran zu sehen. Mit großer Wahrscheinlichkeit beruhen sie auf einer spontanen Aggregation des kanalbildenden Proteins in wäßriger Lösung, die bei niedriger Ionenkonzentration und neutralem pH-Wert begünstigt wird. Proteine mit ausgeprägt asymmetrischer Ladungsverteilung benötigen zur Lösung bzw. Löslichkeitstabilisierung eine relativ hohe Ionenkonzentration (Jakubke und Jeschkeit, 1982). Dieser Effekt beruht auf der Zurückdrängung der Assoziation bzw. Aggregation von Proteinmolekülen durch Anlagerung niedermolekularer Gegenionen. Es resultiert eine starke Hydratisierung und Löslichkeitsverbesserung der Proteine, ihre Reassoziatio n wird verhindert.

Detaillierte elektrochemische Untersuchungen zum Inkorporationsverhalten des Phalloporins bei verschiedenen Ionenstärken der Elektrolytlösungen stehen noch aus. Derzeitig existierende, qualitative Daten unterstützen die Vermutung, daß in niedrigen Ionenstärken (≤ 150 mM) - neben der bekannten Einzelkanalleitwertstufe bei Ionenstärken ≥ 500 mM - größere Leitwertstufen auftreten können. Ihre Existenz kann damit in Analogie zum Alamethicin- und Rubescensporin (Boheim et al., 1983; Wilmsen, 1987) auf die Inkorporation größerer Proteinaggregate zurückgeführt werden. In den hier gezeigten Bilayerexperimenten zur Bestimmung der spezifischen Kanaleinbaur ate liegt wahrscheinlich das Dissoziationsgleichgewicht zwischen größeren und kleineren Molekülaggregaten aufgrund der hohen Ionenstärke (1 M NaCl) mehr auf Seiten der kleinen Aggregate bzw. der Monomeren. Die in höherer Konzentration auftretenden kleinen Phalloporinaggregate (möglicherweise Dimere) können durch die pH-induzierte Neutralisation (Kapitel 1.3.2.2) direkt in die hydrophobe Lipidmatrix inkorporiert werden und bilden als solche ohne weitere intramembranäre Aggregation die ionenpermeablen Kanäle aus. Daß sich dieses Inkorporations- und Kanalbildungsverhalten des Phalloporins durch Modifikation des Molekülzustandes ändern kann, soll in einem späteren Abschnitt anhand des Phalloporineinbaus nach Hitze- und Methanoldenaturierung diskutiert werden (Kapitel 4.3.3).

4.3.2 Isoelektrischer Punkt (p. I.) und pH-abhängige Kanalinkorporation

Nach der isoelektrischen Fokussierung der aufgereinigten Phalloporinprobe konnten zwei Proteine mit isoelektrischen Punkten mit ca. p.I. 6.3 und p.I. 7.3 identifiziert

werden (Kapitel 3.5). Der Hauptanteil des Proteinmaterials fällt dabei auf das Protein mit dem sauren p.I. Es ist anzunehmen, daß die beiden Proteinkomponenten nach der isoelektrischen Fokussierung mit den nach gelelektrophoretischer Trennung auftretenden 19k- und 14k-Proteinkomponenten übereinstimmen. Das würde bedeuten, daß das absplaltbare, in der FII-Probe in geringerem Anteil vorliegende 14k-Protein, mit der Proteinkomponente mit dem neutral bis basischen p.I. zu identifizieren ist. Die kanalbildende Proteinkomponente des 19k-Proteins wäre dementsprechend mit dem Protein mit p.I. 6.3 identisch. Ein weiterer Befund spricht für die Identität des kanalbildenden 19k-Proteins mit der sauren Proteinkomponente aus der Fokussierung. Aus der Ionenaustauschchromatographie ist bekannt, daß das kanalbildende Protein bei neutralem pH-Wert eine mehr oder weniger starke Bindung zur DEAE-Matrix eingeht und nur durch höhere Salzkonzentrationen eluiert werden kann (Kap. 3.2.5). Das setzt voraus, daß das bindende Protein im neutralen pH-Bereich eine negative Nettoladung trägt. Diese Bedingung wird eher durch das Protein mit dem sauren isoelektrischen Punkt erfüllt und macht die Identität der kanalbildenden Komponente des Phalloporins mit dem Protein mit p.I. ~ 6.3 wahrscheinlich.

Hervorzuheben ist die Tatsache, daß der pH-induzierte, spontane Phalloporineinbau gerade in dem pH-Bereich (≤ 6.3) einsetzt (Abb. 1.7), der in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Hauptkomponente des Phalloporins liegt. Nach Wilmsen (1987) beruht der spontane Phalloporineinbau auf einer pH-induzierten Veränderung des Kanalbildners selbst, in dem durch die Protonierung eines oder mehrerer Aminosäurereste des Moleküls die Aktivierungsenergie für die Einlagerung in die hydrophobe Bilayermatrix stark herabgesetzt und so die spontane Kanalinsertion begünstigt wird. Der effektive pK-Wert der protonierten Aminosäurereste kann für die verwendeten Lipidmembranen mit 4.8 - 5.0 und die Anzahl der beteiligten Protonen mit 1 - 2 angegeben werden (Wilmsen, 1987). Bei neutralen Membranen kann sich dieser Wert erniedrigen (Wilmsen, 1983). Eine ähnliche pH-Abhängigkeit ist für den Einbau der Colicine A und E_1 und das C-terminale Fragment in künstliche Lipidmembranen und Lipidvesikeln beschrieben worden (Pattus et al., 1983; Davidson et al., 1984; Davidson et al., 1985). Der pH-abhängige Einbau dieser Kanalbildner ist - wie beim Phalloporin - maximal bei niedrigen pH-Werten mit einem effektiven pK-Wert von 4.6 beim Colicin E_1 und einem pK-Wert von 4.0 beim C-terminalen Fragment. Wie beim Phalloporin hängt auch hier die pH-abhängige Inkorporation nicht von der Membranspannung ab (Davidson et al., 1985). Die niedrigen pK-Werte implizieren die Beteiligung von einem oder mehreren sauren Aminosäureresten, die durch ihre Protonierung die effektive Bindung und Insertion des Kanalbildners in die Lipidmem-

branen begünstigen (siehe dazu Tabelle 4.1). Für die ebenfalls kanalbildenden Toxine des Diphtherie-Toxins (Donovan et al., 1981; Kagan et al., 1981; Sandvig und Olsnes, 1981) und des Botulinus-Toxins (Donovan und Middlebrook, 1986) kann - wie beim Phalloporin - eine Übereinstimmung der für die Kanalinkorporation effektiven pH-Werte mit den isoelektrischen Punkten der Kanalproteine festgestellt werden (Donovan und Middlebrook, 1986). Bezeichnenderweise liegen auch hier die effektiven pH-Werte zur Inkorporation in den Bereichen von 4 - 6.5 (Sandvig und Olsnes, 1981; Donovan und Middlebrook, 1986). Diese Befunde unterstützen die Vorstellung, daß vorrangig die Neutralisation einer oder mehrerer negativer Ladungen Voraussetzung dafür ist, daß die wasserlösliche Kanalkonformation eine ungeladene und damit hydrophobere Konformation annehmen muß, um in dieser Form spontan in die Lipidmatrix inkorporieren zu können (Donovan und Middlebrook, 1986; Wilmsen, 1987). Aufgrund des sauren p.I.'s kann auch für das Phalloporin ein höherer Anteil an sauren Aminosäureresten angenommen werden, die z. T. durch Protonierung neutralisiert werden und damit die pH-induzierte Kanalinkorporation (s. o.) steuern können.

4.3.3 Kanalinkorperationsverhalten nach Denaturierung

Nach der irreversiblen Denaturierung des Phalloporins durch Methanol oder Hitzebehandlung bleibt eine phalloporininduzierte Leitfähigkeitserhöhung künstlicher Lipidmembranen erhalten (Kapitel 3.2.7 und 3.6.2). Allerdings zeigen die Kanaleinbaukurven nach Applikation der methanolgelösten oder hitzebehandelten Phalloporinproben, daß sich das Inkorporationsverhalten drastisch geändert hat. Anders als beim nativen Phalloporin verläuft der induzierte Stromzuwachs hier zunehmend schneller und kann formal in beiden Fällen durch einen einfach exponentiellen Prozeß beschrieben werden.

Überraschenderweise ähnelt das modifizierte Einbauverhalten sehr stark dem typischen Kanalinkorperationsverlauf des in wäßrigen Extrakten von *Amanita rubescens* vorkommenden Rubescensporin (Wilmsen, 1987). Auch das Rubescensporin vermag nach Zugabe zu künstlichen Lipidmembranen spontan die Leitfähigkeit des Bilayers um Größenordnungen zu erhöhen. In Abb. 4.1 ist eine typische Vielkanal-Einbaukurve von Rubescensporin dargestellt. Im Gegensatz zum Phalloporin ist der spontane Einbau des Rubescensporin über den gesamten pH-Bereich von 4 - 9 jedoch in Abhängigkeit von der Membranspannung möglich. Im neutralen bis basischen Bereich verläuft die Erhöhung der Membranleitfähigkeit bei entsprechender Membranspannung exponentiell ansteigend mit der Zeit und erreicht innerhalb der Meßzeit

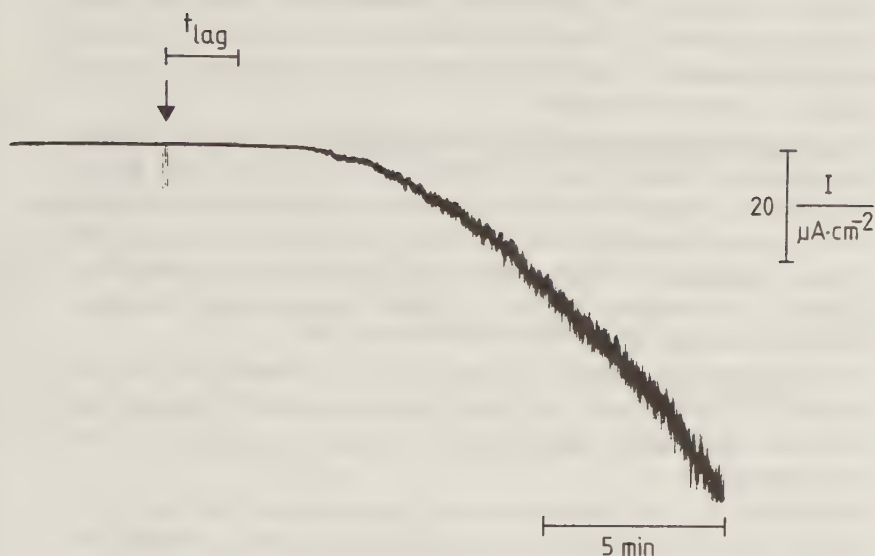


Abb. 41: Vielkanaleinbaukurve des Rubescensporins aus *Amanita rubescens*
Aus Wilmsen, 1987

Die Abbildung zeigt eine charakteristische Vielkanaleinbaukurve nach Applikation des wasserlöslichen kanalbildenden Rubescensporins aus *Amanita rubescens*. Der Beginn der Stromspur markiert die niedrige Leitfähigkeit der reinen, undotierten Membran bei einer konstanten Membranspannung von -100 mV . Etwa 2 min (t_{lag}) nach Zugabe von Rubescensporin (senkrechter Pfeil nach unten) beginnt die Zunahme des Membranstroms, die Stromkurve verläuft entsprechend zur Vorzeichenkonvention nach unten.

Die experimentellen Bedingungen können wie folgt angegeben werden:

Lipid: 1,2 POPC, 1,2-DOPS, Cholesterol ($7 : 2 : 1$)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl , $10\text{ mM Hepes pH } 7.0$

Proteinkonzentration: $0.86\text{ }\mu\text{g/ml}$

keinen stationären Endwert (Wilmsen, 1987). Während es sich beim nativen Phalloporin um die Inkorporation einheitlich strukturierter Komplexe handelt, kann der exponentielle Stromanstieg nach Applikation des Rubescensporins - ähnlich wie beim Alamethicin und Melittin - auf einen stufenweisen Assoziationsprozeß von Monomeren zu größeren Aggregaten in der Membran zurückgeführt werden (Boheim et al., 1983; Hanke et al., 1983; Wilmsen, 1987).

Die makroskopische Membranleitfähigkeit des Rubescensporins läßt sich bei hoher Stromauflösung als Folge diskreter Einzelkanalfluktuationen darstellen (Abb. 4.2). Im Unterschied zum Phalloporin können hier mindestens drei Leitwertstufen unterschieden werden, die nicht ganzzahlige Vielfache voneinander sind. Das Auftreten der verschiedenen Leitwertstufen weist ebenfalls auf einen Kanalbildungsmechanismus durch Aggregation von Proteinmonomeren in der wäßrigen Phase und/oder in der Membran hin (Wilmsen, 1987).

Aus den sehr ähnlichen Verläufen der Einbaukurven des Rubescensporins und des modifizierten Phalloporins kann man ableiten, daß die irreversible Denaturierung des Kanalbildners eine weniger stabile Wechselwirkung der Proteinmonomeren in der Membran bewirkt.

Ein weiteres Indiz für ein verändertes Verhalten des denaturierten Phalloporins in der wäßrigen Phase bietet die Beobachtung, daß die Verzögerungszeit t_{lag} (Kapitel 3.2.7.1 und 3.6.2) bis zum ersten Auftreten der Membranleitfähigkeitserhöhung reduziert wird. Für die Verzögerungszeit ist sowohl beim nativen Phalloporin als auch beim Staphylococcus α -Toxin eine Proteinkonzentrationsabhängigkeit in der Weise gefunden worden, daß mit zunehmender Konzentration die Verzögerungszeit verkürzt wird (Belmonte et al., 1986; Wilmsen, 1987). Innerhalb dieses Zeitraumes muß eine Vielfalt von Prozessen nach Applikation des Kanalbildners in der wäßrigen Phase ablaufen. Zu ihnen gehören u. a. die Diffusion der Kanalstrukturen zur Membran, evtl. notwendige Konformationsänderungen, die Adsorption an die Membran oder Orientierungsprozesse im adsorbierten Zustand des Kanal-moleküls. Die verkürzte Verzögerungszeit im Zusammenhang mit dem stark assoziierenden Kanalinkorporationsverhalten des modifizierten Phalloporins könnte damit erklärt werden, daß das Gleichgewicht hier wesentlich auf seiten der Monomeren liegt. Ähnlich wie beim Rubescensporin, Alamethicin und Melittin würde die nur kurzzeitig stabile Aggregation einer variablen Anzahl von Monomeren zur Ausbildung der Kanalaggregate mit einer diskreten Sequenz von Leitwerten führen (Boheim, 1974; Boheim et al., 1983; Hanke et al., 1983; Wilmsen, 1987).

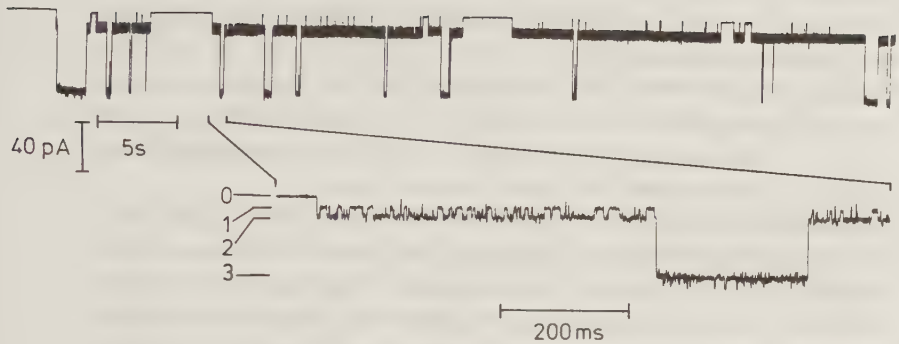


Abb. 42: Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins

Aus Wilmsen, 1987

Bei niedrigen Proteinkonzentrationen läßt sich das Schaltverhalten einzelner Rubescensporinkanäle in Lipidmembranen beobachten. Öffnungsereignisse werden als Stromablenkung nach unten registriert. Die untere Stromspur zeigt einen Ausschnitt der oberen Stromspur bei einer gedehnten Zeitskala. Neben einem nichtleitenden Zustand (0) kann der Kanal innerhalb eines Bursts mindestens 3 verschiedene Leitwertstufen annehmen (Niveau 1, 2 und 3), die sich in ihren Leitwerten unterscheiden. Die jeweiligen Leitwerte in Bezug auf das 0-Niveau sind 100 pS, 180 pS und 690 pS.

Experimentelle Bedingungen:

Lipid: 1,2 POPC, 1,2 DOPS, Ei-PE, Cholesterol (6 : 2 : 1 : 1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl, 10 mM Hepes pH 7.0

Membranspannung: -80 mV

Proteinkonzentration: 80 ng/ml

Die Überlegungen zum modifizierten Einbauverhalten des denaturierten Phalloporins bleiben trotz der Übereinstimmung des makroskopischen Membranleitfähigkeitsverhaltens mit dem Rubescensporin insofern rein spekulativ, da der zugrundeliegende Aggregationsprozeß bisher noch nicht im Einzelkanalverhalten durch die Existenz diskreter, unterschiedlicher Leitwertstufen des modifizierten Phalloporins nachgewiesen werden konnte. Bei den Registrierungen der Vielkanaleinbaukurven sind die Stromschwankungen so schnell, daß unter den vorgegebenen meßtechnischen Bedingungen keine Einzelkanalfluktuationen mehr zu erkennen sind (Abb. 3.12 c)). Die Frage, inwieweit durch eine derartige Denaturierung die Kinetik des Einzelkanals und somit auch die makroskopische Leitfähigkeitserhöhung der Membran verändert wird, läßt sich nur durch die gezielten Untersuchungen des Einzelkanalverhaltens beantworten, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt wurden.

Weiterhin bleibt offen, worauf die Modifikation durch organische Lösungsmittel oder Hitzebehandlung beruht. Allgemein versteht man unter Denaturierung alle auf physikalische und chemische Einflüsse zurückzuführenden Veränderungen des nativen Proteins, die unter Beibehaltung der ursprünglichen Primärstruktur von einem mehr oder weniger vollständigen Verlust der biologischen Aktivität begleitet sind (Jakubke und Jeschkeit, 1982; Löffler, 1985). Durch die Denaturierung mit organischen Lösungsmitteln oder Hitzeeinwirkung werden vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben. Bei einer längeren und stärkeren Einwirkung der Denaturierungsmittel führen unkontrollierte intramolekulare Aggregationen zu einer ungeordneten Knäuelstruktur und damit zur irreversiblen Denaturierung. Der Übergang vom nativen Zustand in die denaturierte Form ist oft mit einer Verringerung der Hydratation und der Löslichkeit und durch Verschiebung des p.I.'s durch zusätzliche exponierte ionisierende Gruppen verbunden (Jakubke und Jeschkeit, 1982). Für das Phalloporin kann durch die irreversible Denaturierung in beiden Fällen aufgrund des veränderten Inkorporationsverhaltens vor allem eine Änderung des Löslichkeitsverhaltens angenommen werden. Erstaunlich ist, daß trotz der irreversiblen Denaturierung, die bei den meisten Proteinen mit einem Verlust der biologischen Aktivität einhergeht, im Falle des Phalloporins eine hohe membranleitfähigkeitserhöhende Aktivität erhalten bleibt. Im Gegensatz zum hämolytisch aktiven Phallolysin (Seeger et al., 1973; Seeger, 1975), zeichnet sich das kanalbildende Protein aus *Amanita phalloides* daher als thermo- und alkoholstabiler aus.

4.3.4 Protease-Resistenz

Das native kanalbildende Protein aus *A. phalloides* erwies sich - genau wie das α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Tobkes et al., 1985) - als resistent gegenüber unspezifischen Proteasen. Erst durch die Bindung von SDS-Molekülen an die hydrophoben Regionen des Proteins werden anscheinend durch die Auffaltung des Proteins die proteasesensitiven Bindungsstellen exponiert (Kapitel 3.6.1).

4.4 Der Phalloporin-Ionenkanal im Vergleich zu Ionenkanälen aus Bakterien und Pflanzenzellen

In der Tabelle 4.1 sind einige Eigenschaften des wasserlöslichen Phalloporins aus *A. phalloides* den entsprechenden Daten für einige wasserlösliche kanalbildende Bakterientoxine gegenübergestellt. Auffällig ist in erster Linie die ähnliche pH-Abhängigkeit der Kanalinkorporation des Phalloporins im Vergleich zum Colicin E_1 , Diphtherie-, Botulinus- und Tetanus-Toxin bzw. deren Fragmente. In allen Fällen ist die spontane Kanalinkorporation im sauren pH-Bereich maximal. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei allen um einen Typus von Kanalproteinen, der durch die Protonierung einer oder mehrerer Aminosäurereste und die daraus resultierende Konformationsänderung des Proteins von einer hydrophileren in eine hydrophobere Form umgewandelt werden kann (Kapitel 4.3.2). Für die Kanalinkorporation des Colicin E_1 und des C-terminalen Fragments sowie des Phalloporins können effektive pK-Werte angegeben werden, die die Beteiligung von sauren Aminosäureresten bei der pH-abhängigen spontanen Kanalinkorporation in die hydrophobe Lipidmatrix implizieren. Für das Diphtherie-, das Botulinus- und das Tetanus-Toxin ist der pH-Bereich aufgeführt, bei dem eine maximale Inkorporation des jeweiligen Kanalbildners zu beobachten ist. Neben der charakteristischen pH-abhängigen Inkorporation kann darüber hinaus eine Übereinstimmung in der Größenordnung der Einzelkanalleitwerte gezeigt werden, die ihre Entsprechung in den abgeschätzten und experimentell bestimmbareren Kanaldurchmessern findet. Im Gegensatz zu den schwach selektiven Bakterientoxinen (Kagan et al., 1981, Boquet und Duflot, 1982, Davidson et al., 1984 und Hoch et al., 1985) handelt es sich bei dem Phalloporin um einen kationenselektiven Kanal (Wilmsen et al., 1985, Wilmsen 1987).

Tabelle 41

	M_r	p.I.	Kanal- durchmesser	Λ_k	pH-abhängige Inkorporation	Literatur
Phalloporin	19k	6.2	$\geq 5-6 \text{ \AA}$	52 pS 1 M NaCl pH 4.5	pK 4.8-5.0	Wilmsen, 1985 Wilmsen, 1987
Colicine E ₁ , bzw. C-term. Fragment	60k 20k	9.2 —	6-8 $\text{\AA}$	20 pS 1 M NaCl pH 4.0	pK 4.6 pK 3.8-4.0	Cramer et al., 1983 Davidson et al., 1984 Davidson et al., 1985
Diphtheria-Toxin- Fragment B ₄₅	24k	5.1	5-18 $\text{\AA}$	20 pS 1 M NaCl pH 4.9	pH ≤ 4.7	Kagan et al., 1981 Boquet u. Duflo, 1982 Hoch et al., 1985
Botulinus-Toxin- Fragment	100k	6.5	$\geq 7-8 \text{ \AA}$	15pS, 20pS 1 M KCl pH 7.0, pH 4.0	pH ≤ 6.1	Hoch et al., 1985 Donovan and Middlebrook, 1986
Tetanus-Toxin- Fragment C, B	100k	—	$\geq 7-8 \text{ \AA}$	15pS, 45pS 1 M KCl pH 4.0, pH 7.0	pH ~ 4.0	Boquet u. Duflo, 1982 Hoch et al., 1985

M_r : relative molare Masse

p.I.: isoelektrischer Punkt

Λ_k : Einzelkanalleitwert bei entsprechender Elektrolytlösung und entsprechendem pH-Wert

Für die pH-abhängige Inkorporation des Diphtherie-, Botulinus- und Tetanus-Toxin ist der pH-Bereich der maximalen Inkorporationsrate angegeben.

Die kanalbildenden Eigenschaften des nativen Proteinmoleküls lassen sich im Falle des Diphtherie-Toxins und des Colicins durch die proteaseabspaltbaren Proteinfragmente B₄₅ des Diphtherie-Toxins und des C-terminalen Fragments des Colicin E₁-Proteins rekonstituieren. Die relativen molaren Massen des kanalbildenden Phalloporins und der kanalbildenden Proteindomänen aus den beiden Bakterientoxinen zeigen damit eine weitere Gemeinsamkeit des Kanalbildners aus *A. phalloides* mit Vertretern der wasserlöslichen, kanalbildenden Bakterientoxinen auf.

Die ähnlichen Eigenschaften des Ionenkanals aus *A. phalloides* und der Bakterientoxine ließen bei der Betrachtung der physiologischen Bedeutung des Ionenkanals die Überlegungen aufkommen, daß die kanalbildende Komponente auf präparativ bedingte Kontaminationen mit parasitären Bakterien zurückzuführen ist. Von der Pilzgattung *Amanita* ist bekannt, daß einige ihrer Vertreter fast ausschließlich symbiotisch über die Ausbildung einer ektotrophen Mycorrhiza mit Baumwurzeln leben (Straßburger, 1978). In der Rhizosphäre können Bodenbakterien sehr eng mit den Pilzhyphen assoziiert sein und als Stickstoff-Lieferanten eine aktive Rolle im Mycorrhiza-Komplex spielen (Marks und Foster, 1973). Da sowohl Hüte und Stiele der Pilzfruchtkörper zur Extraktion des Phalloporins aus *A. phalloides* Verwendung fanden, könnte über die an den Stielen noch anheftenden Myzelien eine Kontamination mit Bakterien möglich gewesen sein. Die bakteriell produzierten wasserlöslichen Toxine könnten damit sowohl in den abtropfenden, wäßrigen Extrakten des Pilzes als auch in den cytosolischen Fraktionen nach differentieller Zentrifugation auftreten. Dagegen spricht allerdings die höhere Ausbeute an kanalbildendem Protein nach der Homogenisation des Pilzmaterials nach dem V₂-Verfahren, die auf eine intrazelluläre Lokalisation des Kanalbildners schließen läßt. Eine intrazelluläre Resorption infizierender Bakterien oder Bakterioide - wie sie bei der Symbiose von Leguminosen mit Rhizobienstämmen auftreten kann (Straßburger, 1978) - ist bei *Amanita*-Pilzen nicht bekannt.

Kann man den Phalloporin-Ionenkanal einerseits aufgrund seiner überraschend ähnlichen Eigenschaften der großen Gruppe wasserlöslicher Kanalbildner zumeist aus Prokaryonten-Zellen zuordnen, so unterscheidet er sich andererseits in seinem Ionen- und spannungsabhängigen Einzelkanalverhalten stark von den Vertretern dieser Gruppe (Wilmsen, 1987). Durch die unter Kontrolle von H⁺-Ionen und der Membranspannung stehenden Schaltkinetik des individuellen Phalloporinkanals kann er funktional in die liganden- und spannungsaktivierbaren Kanaltypen eingeordnet werden (3.2.1), die bisher vor allem als Ionentransportsysteme in tierischen Zellmembranen nachgewiesen wurden (Kapitel 1.1.2). Der Wissensstand über derartige spannungs- und ligandenabhängige Ionenkanäle in pflanzlichen Zellen ist z. Z. noch sehr begrenzt.

In Analogie zu den passiven ionalen Transportprozessen bei der Muskel- und Nerven-erregung konnten die Ionenbewegungen an elektrisch erregbaren pflanzlichen Zellmembranen über Voltage-clamp-Messungen an Algenzellen (*Chara*, *Nitella*) ebenfalls auf die Existenz von spannungsabhängigen Ionenkanälen zurückgeführt werden (Gaffey und Mullins, 1958; Beilby und Coster, 1979; Shiina und Tazawa, 1987). Aufgrund der spezifischen Morphologie und Kompartimentierung der pflanzlichen Zellen beschränkten sich die elektrophysiologischen Untersuchungen lange Zeit auf die Messungen des Membranwiderstandes und des Membranpotentials an großen Algenzellen (Moran et al., 1984). Erst durch die in den letzten Jahren entwickelte Patch-clamp-Methode an isolierten Proto- und Tonoplasten und die Rekonstitutionsversuche an künstlichen Lipidmembranen gelang der Nachweis einzelner, spannungsabhängiger Ionenkanäle in höheren Pflanzenzellen. Sie zeigen vergleichbare Eigenschaften, wie die Ionenkanäle in tierischen Zellmembranen (Moran et al., 1984).

In der Tabelle 4.2 werden einige durch die Patch-clamp-Methodik identifizierte Ionenkanäle im Plasmalemma und im Tonoplasten mit den durch Rekonstitution in künstlichen Lipidmembranen nachgewiesenen Ionenkanälen in Mitochondrienmembranen pflanzlicher Zellen bezüglich ihres Einzelkanalverhaltens verglichen.

Im Gegensatz zu den zumeist unselektiven Bakterientoxinen kann bei der Mehrzahl der aufgeführten, membranintegrierten Ionenkanäle höherer Pflanzen - genau wie beim Phalloporin - eine Ionenselektivität gemessen werden. Mit der spannungsabhängigen - im Falle der Ca^{++} -aktivierbaren Kanäle aus dem Tonoplasten von *Beta vulgaris*, auch ligandenabhängigen - Schaltkinetik zeigen die pflanzlichen Ionenkanäle damit eine weitere Parallelität zum Einzelkanalverhalten des Phalloporins auf.

Einzig der in den äußeren Mitochondrienmembranen identifizierbare, anionenselektive und spannungsabhängige Ionenkanal aus *Neurospora crassa* und *Zea mays* unterscheidet sich aufgrund seines hohen Leitwertes und seiner Selektivität wesentlich vom Phalloporin und den membranintegrierten Ionenkanälen höherer Pflanzen.

Biochemische Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung der beschriebenen, spannungsabhängigen und ionenselektiven Membrankanäle im Tonoplasten und Plasmalemma von Pflanzenzellen existieren noch nicht. Der Vergleich des Phalloporin-Ionenkanals aus *Amanita phalloides* mit diesen Kanaltypen muß sich auf die wenigen elektrophysiologischen Daten des Einzelkanalverhaltens beschränken.

Zusammengefaßt kann man für den Phalloporin-Ionenkanal feststellen, daß er in Bezug auf seine charakteristischen Einzelkanal- und Inkorporationseigenschaften eine Sonderstellung einnimmt. Zum einen kann er zur Gruppe der wasserlöslichen, zumeist

Tabelle 4.2

	Λ_K	Spannungs- abhängigkeit d. Einzelkanals	Selektivität	Literatur
Ionenkanäle im Plasmalemma von Weizenprotoplasten	10-20 pS, 35-40 pS, 50 mM 70-100 pS, NaCl 160-180 pS,	— + — —	n.b.	Moran et al., 1984
K ⁺ -Kanal im Plasma- lemma von Vicia faba-Protoplasten	37 pS, 225 mM KCl	—	$(P_{K^+}/P_{Na^+}) \approx 11$	Schroeder et al., 1984
K ⁺ -Kanal im Tono- plasten von Gersten- mesophyllzellen	121 pS, 250 mM KCl	+	$(P_{K^+}/P_{Na^+}) \approx 10$	Kolb et al., 1986 Kolb et al., 1987
Ca ²⁺ -aktivierb. Kanäle im Tonoplasten von Beta vulgaris	60-80 pS, 200 mM KCl 30-40 pS, 200 mM KCl	+ + +	$(P_{K^+}/P_{Na^+}) \approx 6$ $(P_{K^+}/P_{Na^+}) \approx 1$	Hedrich und Neher, 1987
Unselekt. Ionenkanal im Tonoplasten von Beta vulgaris	180 pS, 200 mM	+	—	Coyaud et al., 1987
VDAC's in Mito- chondrienmembranen				Colombini, 1980
v. Neurospora crassa und Zea mays	~ 4.5 nS, 1 M KCl ~ 4.0 nS, 1 M KCl	+ +	$(P_{K^+}/P_{Cl^-}) \approx 1.7$ $(P_{K^+}/P_{Cl^-}) \approx 1.7$	Mannella et al., 1983 Smack und Colombini, 1987 Colombini, 1987

Λ_K : Einzelkanalleitwert bei entsprechender Elektrolytlösung und neutralem pH-Wert

n.b.: nicht bekannt

von Prokaryonten produzierten Kanalbildnern gerechnet werden, zum anderen zeigen sich Parallelitäten zu den spannungs- und ionenselektiven Kanälen höherer Pflanzenzellen auf. Eine Zuordnung seiner physiologischen Bedeutung ist im derzeitigen Untersuchungsstadium allerdings noch nicht möglich.

4.5 Phallolysin

Aus den vergleichenden Untersuchungen des hämolytischen und des kanalbildenden Proteins aus *Amanita phalloides* können auch für das hämolytisch aktive Phallolysin neuere Befunde zur Diskussion gestellt werden.

Sowohl aus den Ergebnissen zur präparativen Gelfiltration (Kapitel 3.2.3), der methanolischen Präzipitation (Kapitel 3.2.7.2) als auch der analytischen Gelfiltration (Kapitel 3.3.1) kann die Hämolyseaktivität vorwiegend mit einer auf SDS-Gelen mit M_r 26k identifizierten Proteinkomponente korreliert werden. Die nach Faulstich et al. (1983) mit dem Phallolysin identische 34k-Proteinkomponente ist nach der präparativen und der analytischen Gelfiltration nur noch als schwach gefärbte Nebenbande zu identifizieren. Den Ergebnissen aus der methanolischen Präzipitation der aufgereinigten Phallolysinprobe zufolge, läßt sich darüberhinaus die 34k-Proteinbande als hämolytisch aktive Proteinkomponente ausschließen (Kapitel 3.2.7.2). Dieser Widerspruch zu den von Faulstich et al. erhaltenen Daten kann möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Gelsysteme zurückzuführen sein. Während die hier gezeigten Elektrophoresen hauptsächlich auf 15%-igen SDS-Gelen durchgeführt wurden, erfolgte die Bestimmung der relativen molaren Masse bei Faulstich et al. (1983) auf einem 12%-igen Gel. Wie aus der Abb. 3.1 hervorgeht, ist in den von Faulstich aufgereinigten Phallolysinproben auf 10%-igen SDS-Gelen ein erheblicher Proteinanteil auch im niedermolekularen Molmassenbereich nachweisbar. Durch die Verwendung eines Gelsystems mit höherem Trennvermögen im niedermolekularen Bereich ist es evtl. möglich, diesem Proteinanteil genauer relative molare Massen zuzuordnen zu können. Erschwerend für eine exakte Molmassenbestimmung des Phallolysin unter Anwendung der SDS-PAGE muß berücksichtigt werden, daß es sich beim hämolytisch aktiven Protein wahrscheinlich um ein Glycoprotein mit hohem Anteil ($\geq 25\%$) an neutralen Zuckern handelt (Faulstich und Weckauf-Bloching, 1974). Eine Molmassenbestimmung bei Glycoproteinen mit mehr als 10% Kohlenhydratanteilen führt aufgrund einer reduzierten Bindung von SDS-Molekülen zu einem geringeren

Ladung/Masse-Verhältnis und somit durch eine verminderte Mobilität zu höheren apparenten Molmassen (Segrest et al., 1971). Da in höher quervernetzten Polyacrylamidgelen der Molekularsiebeffekt gegenüber dem Trenneffekt nach Proteinladung überwiegt, sind für Glycoproteine mit diesen Gelsystemen Molmassen zu bestimmen, die den realen Molekülgrößen genauer entsprechen (Segrest und Jackson, 1972). Der relativ hohe Zuckeranteil könnte überdies eine Erklärung dafür sein, daß die unter nativen gelelektrophoretischen Bedingungen auftretende Hauptprotein Komponente des Phallolysins mit einem Proteinkomplex mit sehr viel höherer molarer Masse assoziiert ist als durch die Gelfiltration ermittelbar (Kapitel 2.2.4 und 2.2.6).

Bei der Bestimmung der relativen molaren Masse des nativen Phallolysins über Ultrafiltration (Faulstich und Weckauf-Bloching, 1974) bzw. über Gelfiltration (Seeger, 1975) war die Hämolyseaktivität mit Molmassen zwischen 30 kD und 50 kD assoziiert. Aus der analytischen Gelfiltration über Sephacryl S-300 kann in Übereinstimmung mit den Literaturwerten eine Molmasse zwischen M_r 30k - M_r 40k für den nativen Phallolysinkomplex angenommen werden (Kapitel 3.3.1).

Die isoelektrische Fokussierung der hämolytisch aktivsten Poolfraktion nach der Gelfiltration trennte die Proteinprobe in drei Proteinhauptkomponenten mit pI-Werten von 8.3, 7.5 und 6.9 und einer nur schwach gefärbten Komponente bei 6.7 auf. Nach Faulstich et al. (1983) können dem Phallolysin nach isoelektrischer Fokussierung 2 - 3 Proteinkomponenten mit pI. 8.1, 7.6 und 7.0 zugeordnet werden. Seeger fand in aufgereinigten, hämolytisch aktiven Phallolysinproben nach entsprechender Fokussierung zwei Proteinkomponenten mit isoelektrischen Punkten bei 8.34 und 7.5 (Seeger, 1975). Die in ihren isoelektrischen Punkten nahezu übereinstimmenden Proteinkomponenten bei pI. 8.1 - 8.34 und pI. 7.5 - 7.6 sind sehr wahrscheinlich in allen drei Fällen identisch und können dem hämolytisch aktiven Phallolysin zugeordnet werden.

Im Gegensatz zum proteaseresistenten kanalbildenden Protein kann das hämolytisch aktive Protein aus *Amanita phalloides* durch unspezifische Proteasen abgebaut werden (Kapitel 3.6.1).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Nicht-Identität des hämolytisch aktiven *Phallolysins* mit dem Ionenkanal-bildenden *Phalloporin* aus wäßrigen Extrakten des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* gezeigt.

Durch die Entwicklung eines spezifischen Kanalinkorporationstests an künstlichen planaren Lipidmembranen kann der relative Anteil der kanalbildenden Proteinkomponente in verschiedenen Proteinpräparationen quantifiziert und miteinander verglichen werden. Dies ermöglicht die kontrollierte Isolierung und bis zu 350-fache Anreicherung des Ionenkanal-bildenden Phalloporins über Ammoniumsulfatfällung und Sephacryl S-300-Gelfiltration.

Bei dem Ionenkanal-bildenden Phalloporin handelt es sich um ein wasserlösliches, gegenüber unspezifischen Proteasen resistentes und wahrscheinlich cytosolisches Protein, das sich bei niedrigen pH-Werten spontan in künstliche Lipidmembranen inkorporiert.

Eine teilweise aufgereinigte Phalloporinprobe wird in der SDS-Gelelektrophorese in zwei Proteinkomponenten mit M_r 19k und M_r 14k aufgetrennt. Die kanalbildende Aktivität kann allein durch die aus SDS-Gelen eluierte 19k-Proteinkomponente in künstlichen Lipidmembranen rekonstituiert werden.

Durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese kann die 19k-Proteinkomponente mit Proteinkomplexen korreliert werden, die sich unter nativen Bedingungen mit relativen molaren Massen von M_r 30k - 40k, 60k - 80k und 200k - 240k gelelektrophoretisch trennen lassen. In der analytischen Gelfiltration ist die kanalbildende Aktivität mit Proteinkomplexen mit relativen molaren Massen M_r 220k - 250k assoziiert. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß das kanalbildende Protein in wäßrigen Lösungen in verschieden aggregierten Zuständen vorliegt.

Nach der isoelektrischen Fokussierung können in der teilweise aufgereinigten Phalloporinprobe zwei Proteinkomponenten mit isoelektrischen Punkten bei p.I. 6.3 und p.I. 7.3 identifiziert werden, wobei der Hauptanteil des Proteins auf die saure Proteinkomponente fällt.

Das charakteristische Einbauverhalten des nativen Phalloporinkanals kann auf die Inkorporation einheitlich strukturierter, fixierter Molekülaggregate zurückgeführt werden. Nach der irreversiblen Denaturierung des Kanalproteins durch das organische Lösungsmittel Methanol und durch Hitzeeinwirkung bleibt eine leitfähigkeitserhöhende

Aktivität an künstlichen Lipidmembranen erhalten, das Inkorporationsverhalten des denaturierten Phalloporins ändert sich allerdings drastisch. Die exponentiell ansteigende, durch denaturiertes Phalloporin induzierte Membranleitfähigkeit kann möglicherweise auf die Ausbildung kurzzeitig stabiler Kanalaggregate mit einer variablen Anzahl von Monomeren erklärt werden.

Literaturverzeichnis

Bamberg, E. und Läuger, P. (1974)

Temperature-dependent properties of gramicidin A channels.
 Biochim. Biophys. Acta 267: 127-133

Bamberg, E., Benz, R., Läuger, P. und Stark, G. (1974)

Ionentransport durch biologische Membranen.
 Chemie in unserer Zeit: 33-43

Beilby, M. J. und Coster, H. G. L. (1979)

The action potential in *Chara corallina*. II. Two activation-inactivation transients in voltage clamps of the plasmalemma.
 Aust. J. Plant Physiol. 6: 323-335

Belmonte, G., Cescatti, L., Ferrari, B., Nicolussi, T., Ropele, M. und Menestrina, G. (1986)

Pore formation by *Staphylococcus aureus* alpha-Toxin in lipid bilayers. Dependence upon temperature and toxin concentration.
 Eur. Biophys. J. 6: 349-358

Benz, R., Janko, K., Boos, W. und Läuger, P. (1978)

Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*.
 Biochim. Biophys. Acta 54: 305-319

Benz, R. (1985)

Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes.
 Critical Rev. in Biochem. 19/2: 145-190

Bernheimer, A. W. (1974)

Interaction between membranes and cytolytic bacterial toxins.
 Biochim. Biophys. Acta 344: 27-50

Bernheimer, A. W. und Avigad, L. S. (1979)

A cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*.
 Biochim. Biophys. 585: 451-461

Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1978)

Molecular nature of the complement lesion.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5655-5659

Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1983)

Membrane damage by channel forming proteins.
 TIBS 8: 134-136

Boheim, G. (1974)

Statistical analysis of alamethicin in black lipid membranes.
J. Membr. Biol. 19: 277-303

Boheim, G., Hanke, W., Barrantes, F. J., Eibl, H., Sakmann, B., Fels, G. und Maelicke, A. (1981)

Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3586-3590

Boheim, G., Hanke, W. und Jung, G. (1983)

Alamethicin pore formation: voltage dependent flip-flop of α -Helix dipoles.
Biophys. Struct. Mech. 9: 181-191

Boquet, P. und Dufrot, E. (1982)

Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7614-7618

Bühning, H. J., Vaisius, A. C. und Faulstich, H. (1983)

Membrane damage of liposomes by the mushroom toxin phallolysin.
Biochim. Biophys. Acta 733: 117-123

Bullock, J. O., Cohen, F. S., Dankert, J. R. und Cramer, W. A. (1983)

Comparison of the macroscopic and single channel conductance properties of colicin E1 and its COOH-terminal tryptic peptide.
J. Biol. Chem. 258: 9908-9912

Cohen, F., Zimmerberg, J. und Finkelstein, A. (1980)

Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes.
J. Gen. physiol 75: 251-270

Colley, C. M., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B. und Van Deenen, L. L. M. (1973)

Lytic and non-lytic degradation of phospholipids in mammalian erythrocytes by pure phospholipases.
Biochim. Biophys. Acta 307: 74-82

Colombini, M. (1980)

Pore size and properties of channels from mitochondria isolated from *Neurospora crassa*.
J. Membr. Biol. 53: 79-84

Colombini, M. (1987)

Characterization of channels isolated from plant mitochondria.
Methods in Enzymology 148: 465-475

Cooper, T. G. und Beevers, H. (1969)

Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm: enzyme constituents and catalytic capacity.

J. Biol. Chem. 244: 3507

Cooper, T. G. (1981)

Biochemische Arbeitsmethoden
de Gruyter, Berlin

Coronado, R. und Latorre, R. (1983)

Formation of phospholipid bilayers from monolayers in patch-clamp pipettes.
Biophys. J. 43: 231-236

Coyaud, L., Kurkdjian, A., Kado, R. und Hedrich, R. (1987)

Ion-channels and ATP-driven pumps involved in iontransport across the tonoplast of sugarbeet vacuoles.

Biochim. Biophys. Acta 902: 263-268

Danielli, J. F. und Davson, H. (1935)

A contribution to the theory of permeability of thin films.

J. Cell. Physiol. 5: 495-508

Darszon, A. (1983)

Strategies in the reassembly of membrane proteins into lipid bilayer systems and their functional assay.

J. Bioen. Biomembr. 15: 321-334

Davidson, V. L., Cramer, W. A., Bishop, L. J. und Brunden, K. R. (1984)

Dependence of the activity of colicin E1 in artificial membrane vesicles on pH, membrane potential and vesicle size.

J. Biol. Chem. 259: 594-600

Davidson, V. L., Brunden, K. R. und Cramer, W. A. (1985)

Acidic pH requirement for insertion of colicin E1 into artificial membrane vesicles: relevance of the mechanism of action of colicins and certain toxins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1386-1391

Diamond, J. M. und Wright, E. M. (1969)

Biological membranes: the physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity.

Ann. Rev. Physiol. 31: 581-646

Donovan, J. J., Simon, M. I., Draper, R. K. und Montal, M. (1981)

Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 172-176

Donovan, J. J. und Middlebrook, J. L. (1986)

Ion-conducting channels produced by Botulinum toxin in planar lipid membranes
Biochemistry 25: 2872-2876

Duval, A. und Leoty, C. (1978)

Ion channels in mammalian fast skeletal muscle.
J. Physiol. 278: 403-423

Eisenberg, M., Hall, J. E. und Mead, C. A. (1973)

The nature of voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes.
J. Membr. Biol. 14: 143-176

Faulstich, H. und Weckauf-Bloching, M. (1974)

Isolation and toxicity of two cytolytic glycoproteins from *Amanita phalloides* mushrooms.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1489-1494

Faulstich, H., Zobeley, S. und Weckauf-Bloching, M. (1974)

Cytolytic properties of phallolysin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1495-1498

Faulstich, H., Bühring, H. J. und Seitz, J. (1983)

Physical properties and function of phallolysin.
Biochemistry 12: 4574-4580

Gaffey, C. T. und Mullins, L. J. (1958)

Ion fluxes during the action potential in Chara.
J. Physiol. 144: 505-524

Gordon, L. G. M. und Haydon, D. A. (1972)

The unit conductance channel of alamethicin.
Biochim. Biophys. Acta 255: 1014-1018

Gorter, E. und Grendel, F. (1925)

On the bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood.
J. Exp. Med. 41: 439-443

Habermann, E. (1960)

Zur Toxikologie und Pharmakologie des Gasbrandgiftes (*Clostridium welchii* Typ A) und seiner Komponenten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmac. 238: 502-524

Habermann, E. (1968)

Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie der Inhaltsstoffe von Hymenoptergiften.
Ergebn. Physiol. 60: 220-325

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981)

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.

Pflügers Arch. 391: 85-100

Hamill, O. P., Bormann, J., Sakmann, B. (1983)

Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA.

Nature 305: 805-808

Hanke, W. und Boheim G. (1980)

The lowest conductance state of the alamethicin pore.

Biochim. Biophys. Acta 596: 456-462

Hanke, W. (1981)

Analyse der Eigenschaften porenbildender Antibiotika und Proteine in planaren Lipidmembranen im Bereich der Temperatur der Lipidphasenumwandlung.

Dissertation.

Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.

Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, H. U., Katz, E., Jung, G. und Boheim, G. (1983)

Melittin and a chemically modified trichotoxin form alamethicin-type multistate pores.

Biochim. Biophys. Acta 727: 108-114

Hanke, W. (1984)

Reconstitution of channel proteins from Torpedo electroplax into virtually solvent-free lipid bilayers.

Biochim. Bioeng. 12: 341-351

Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, H. U. und Boheim, G. (1984)

Ion channel reconstitution into lipid bilayer membranes on glass patch pipettes.

Bioelectrochemistry and Bioenergetics 12: 329-339

Hanke, W. (1985)

Reconstitution of ion channels.

Critical Rev. in Biochem. 19/1: 1-44

Haydon, D. A. und Hladky, S. B. (1972)

Ion transport across thin lipid membranes: a critical discussion of mechanism in selected systems.

Quat. Rev. Biophys. 5: 187-282

Hladky, S. B. und Haydon, D. A. (1970)

Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics.

Nature 225: 451-453

Hoch, D. H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., Dasgupta, B. R. und Simpson, L. L. (1985)

Channels formed by botulinum, tetanus and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1692-1696

Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952)

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.

J. Physiol. 117: 500-544

Jakubke, H. D. und Jeschkeit, H. (1982)

Aminosäuren, Peptide, Proteine

Verlag Chemie, Weinheim

Jung, G., Brückner, H. und Schmitt, H. (1981)

Properties of the membrane modifying polypeptide antibiotics alamethicin and trichotoxin A-40. In: Structure and Activity of Natural Peptides (Voelter, W. and Weitzel, G., eds.).

de Gruyter, Berlin, pp. 75-114

Kagan, B. L., Finkelstein, A. und Colombini, M. (1981)

Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4950-4954

Katz, B. (1966)

Nerve, Muscle and Synapse.

McGraw-Hill, New York

Kobayashi, Y. und Nakae, T. (1985)

The mechanism of ion selectivity of OmpF-porin pores of *Escherichia coli*.

Eur. J. Biochem. 151: 231-236

Kolb, H. A., Köhler, K. und Martinoia, E. (1987)

Single potassium channels in membranes of isolated mesophyll barley vacuoles.

J. Membr. Biol. 95: 163-169

Korn, E. D. (1968)

Flows and exchanges. In: Biological Interfaces.

Little, Brown and Co., Boston, p. 257

Kühn, L., Meyer, H., Rutschmann, M. und Thamm, P. (1980)

Identification of photoaffinity labeled insulin receptor proteins by linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis under non-denaturing conditions.

FEBS Lett. 113: 189-192

Kyte, J. (1972)

Properties of the two polypeptides of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase.

J. Biol. Chem. 247: 7642-7649

Laemmli, U. K. (1970)

Clearage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.

Nature 227: 680-685

Läuger, P. und Stark, G. (1970)

Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes.

Biochim. Biophys. Acta 211: 458-466

Läuger, P. (1983)

Conformational transitions of ionic channels. In: Single Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E., eds.).

Plenum Press, London, pp. 177-189

Lehninger, A. L. (1977)

Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen.

Thieme Verlag, Stuttgart

Levinson, S. R. und Meves, H. (1975)

The binding of tritiated tetrodotoxin to squid giant axons.

Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 270: 349-352

Löffler, G., Petrides, P. E., Weiss, L. und Harper, H. A. (1985)

Physiologische Chemie.

Springer Verlag, Berlin

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193: 265-275

MacDonald, J. F., Porietis, A. V. und Wojtowicz, J. M. (1982)

L-Aspartic acid induces a region of negative slope conductance in the current-voltage relationship of cultured spinal cord neurons.

Brain Res. 266: 169-173

Marks, G. C. und Foster, R. C. (1973)

Ectomycorrhizae. In: Physiological Ecology (Marks, G. C. und Kozlowski, T. T., eds.).

Academic Press, New York

Markwell, N. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. und Tolbert, N. E. (1978)

A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.

Anal. Biochem. 87: 206-210

Marty, A. (1981)

Calcium-dependent potassium channels with large unitary conductance in cro-maffin cell membranes.

Nature 291: 497

Mayer, M. M. (1972)

Mechanism of cytolysis by complement.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2954-2959

Menestrina, G. (1986)

Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage dependent inhibition by di- and tri-valent cations.

J. Membr. Biol. 90: 177-190

Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. und Bhakdi, S. (1987)

Escherichia coli haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes.

Biochim. Biophys. Acta 905: 109-117

Methfessel, C. und Boheim G. (1982)

The gating of single calcium-dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanism.

Biophys. Struct. Mech. 9: 35-60

Meyer, P. und Reusser, F. (1967)

A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*.

Experientia 23: 85-86

Michaels, D. W. (1979)

Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*.

I. Formation of transmembrane channels in lipid bilayers.

Biochim. Biophys. Acta 555: 67-78

Miller, C. und Racker, E. (1976)

Ca^{++} -induced fusion of fragmented sarcoplasmatic reticulum with artificial planar bilayers.

J. Membr. Biol. 30: 283-300

Miller, C. (1978)

Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum. Steady-state electrical properties.

J. Membr. Biol. 40: 1-23

Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. und Phillips, M. (1985)

Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca-activated K channels from mammalian skeletal muscle.

Nature 313: 316-318

Montal, M. und Mueller, P. (1972)

Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3561-3566

Montal, M., Suarez-Isla, B. A., Wan, K. und Lindstrom, J. (1983)

Single channel recordings from purified acetylcholine receptor reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipettes.

Biochemistry 22: 2319-2323

Moran, N., Ehrenstein, G. und Iwasa, K. (1984)

Ion channels in plasmalemma of wheat protoplasts.

Science 226: 835-837

Mueller, P., Rudin, D. O., Ti Tien, H. und Wescott, W. C. (1962)

Reconstitution of a cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system.

Nature 194: 979-980

Mueller, P. und Rudin, D. O. (1967)

Development of K^+ - Na^+ discrimination in experimental bimolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 26: 398-410

Nägeli, K. W. (1884)

Mechanisch-Physiologische Theorie der Abstammungslehre.

Oldenbourg, München

Neher, E. und Sakmann, B. (1976)

Single channel currents from membrane of denervated frog muscle fibres.

Nature 260: 779-802

Neher, E. und Stevens, C. F. (1977)

Conductance fluctuations and ionic pores in membranes.

Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6: 345-381

Odenthal, K. P., Mengs, U. und Seeger, R. (1976)

Acute toxic effects of the haemolysin from *Amanita rubescens* after I.V. injection in rats.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: R24

Overton, E. (1902)

Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie.
Pflügers Arch. 92: 115-280.

Pal, R., Barenholz, Y. und Wagner, R. R. (1981)

Pardaxin, a hydrophobic toxin of the red sea flatfish, disassembles the intact membrane of vesicular stomatitis virus.
J. Biol. Chem. 256: 10209-10212

Pattus, F., Cavard, D., Verger, R., Lazdunski, C., Rosenbusch, J. und Schindler, H. (1983)

Formation of voltage dependent pores in planar bilayers by colicin A. in: Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions (Spach, G. ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 407-413

Peterson, A. A. und Cramer, W. A. (1987 a)

Voltage-dependent, monomeric channel activity of colicin E1 in artificial membrane vesicles.
J. Membr. Biol. 99: 197-204

Peterson, A. A. und Cramer, W. A. (1987 b)

Membrane-potential and concentration-dependence of colicin E1 channel formation in artificial membrane vesicles.
Biophys. J. 51: 249 a

Pfeffer, W. F. P. (1899)

Osmotische Untersuchungen.
Engelmann, Leipzig

Robertson, J. D. (1959)

The ultrastructure of cell membrane and their derivatives.
Biochem. Sym. 16: 3-43

Robertson, J. D. (1960)

The molecular structure and contact relationship of cell membranes.
Prog. Biophys. 10: 343-418

Ruff, R. L. (1986)

Ionic channels: II. voltage- and agonist-gated and agonist-modified channel properties and structure.
Muscle and Nerve 9: 767-786

Sakmann, B., Methfessel, C., Mishina, M., Takahashi, T., Takai, T., Kurasaki, M., Fukuda, K. und Numa S. (1985)

Role of acetylcholine receptor units in gating of the channel.
Nature 318: 538-543

Sandvig, K. und Olsnes, S. (1981)

Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH.
J. Biol. Chem. 256: 9068-9076

Schein, S. J., Colombini, A. und Finkelstein, A. (1976)

Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria.
J. Membr. Biol. 30: 99-120

Schein, S. J., Kagan, B. und Finkelstein, A. (1978)

Colicin K acts by forming voltage dependent channels in phospholipid bilayer membranes.
Nature 276: 159-163

Schindler, H. und Feher, G. (1976)

Branched bimolecular lipid membranes.
Biophys. J. 16: 1109-1113

Schindler, H. und Quast, U. (1980)

Functional acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in planar membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3052

Schindler, H. und Rosenbusch (1982)

Chemical modification of matrix porin from *Escherichia coli*. Probing the pore topology of a transmembrane protein.
J. Cell Biol. 92: 742-746

Schroeder, J. I., Hedrich, R. und Fernandez, J. M. (1984)

Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*.
Nature 312: 361-362

Seeger, R. und Lehmann, D. (1973)

Tumorhemmende Wirkung vom Phallolysin aus *Amanita phalloides*.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279: 235-242

Seeger, R., Kraus, H. und Wiedmann, R. (1973)

Zum Vorkommen von Hämolyisin in Pilzen der Gattung *Amanita*.
Arch. Toxikol. 30: 215-226

Seeger, R., Scharrer, H. und Haupt, M. (1973)

Phallolysin, ein hochmolekulares Toxin aus *Amanita phalloides*.
Experientia 29: 829-830

Seeger, R. (1975)

Some physico-chemical properties of phallolysin obtained from *Amanita phalloides*.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 155-162

Seeger, R. (1976)

Purification and some properties of the haemolysin from *Amanita rubescens*.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: R25

Seeger, R., Burkhardt, M., Haupt, M. und Feulner (1976)

The haemolytic effect of phallolysin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293: 163-170

Segrest, J. P., Jackson, R. L., Andrews, E. P. und Marchesi, V. T. (1971)

Human erythrocyte membrane glycoprotein. A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS-PAGE.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44: 390-395

Segrest, J. P. und Jackson, R. L. (1972)

Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.
Methods in Enzymology XXVIII: 54-63

Seitz, J., Adler, G., Stofft, E. und Faulstich, H. (1981)

The mechanism of cytolysis of erythrocytes by the mushroom toxin phallolysin. Morphological and biochemical evidence for sodium influx and swelling.
Eur. J. Cell Biol. 25: 45-53

Shapiro, A. L., Vinuela, E. und Maizel Jr., J. V. (1967)

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28: 815-820

Shemyakin, M. M., Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T., Antonov, V. K., Vinogradova, E. I., Shkrob, A. M., Malenkov, G. G., Evstratov, A. V., Laine, I. A., Melnik, E. I. und Ryabova, I. E. (1969)

Cyclodepsipeptides as chemical tools for studying ionic transport through membranes.
J. Membr. Biol. 1: 401-430

Shiina, T. und Tazawa, M. (1987)

Ca^{2+} -activated Cl^- channel in plasmalemma of *Nitellopsis obtusa*.
J. Membr. Biol. 99: 137-146

Siegel, L. M. und Monty, K. J. (1966)

Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in unpure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductase.
Biochim. Biophys. Acta 112: 346-362

Sigworth, F. J. (1983)

Electronic design of the patch clamp. In: Single Channel Recording (Sakmann, B. und Neher, E., eds.).
Plenum Press, London, pp. 3-35

Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972)

The fluid mosaic model of the structures of membranes.
Science 175: 720-731

Stettmeier, H., Finger, W. und Dudel, J. (1983)

Effects of conoavalin A on glutamate operated postsynaptic channels in crayfish muscle.
Pflügers Arch. 397: 13-19

Straßburger, E., Noll, F., Schenck, H. und Schimper, A. F. W. (1978)

Lehrbuch der Botanik.
Fischer Verlag, Stuttgart

Tanford, C. und Reynolds, J. A. (1976)

Characterization of membrane proteins in detergent solutions.
Biochim. Biophys. Acta 457: 133-170

Tank, D., Miller, C. und Webb, W. W. (1982)

Isolated patch recording from liposomes containing functionally reconstituted chloride channels from Torpedo electroplax.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7749-7754

Tobkes, N., Wallace, B. A. und Bayley, H. (1985)

Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein.
Biochemistry 24: 1915-1920

Urry, D. (1971)

The gramicidin A channel: a proposed $\pi_{(L,D)}$ helix.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 672-676

Varanda, W. und Finkelstein, W. (1980)

Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxins from the sea anemone *Stoichactis helianthus*.
J. Membr. Biol. 55: 203-211

Verkleij, A. J., Zwaal, R. F. A., Roelofs, B., Confurius, P., Kastelijn, K. und Van Deenen, L. L. M. (1973)

The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 323: 178-193

Weber, K. und Osborn, M. (1969)

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. 244: 4406-4412

Williams, B. L. und Wilson, K. (1984)

Methoden der Biochemie.

Thieme Verlag, Stuttgart

Wilmsen, H. U. (1983)

Rekonstitution biologischer Kanalproteine in planaren Lipidmembranen unter Verwendung feuerpolierter Glaspipetten - Untersuchungen zur Protonen- und Spannungsabhängigkeit des Phallolysinkanals. Diplomarbeit.

Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum

Wilmsen, H. U., Methfessel, C., Hanke, W. und Boheim, G. (1983)

Channel current fluctuation studies with solvent free lipid bilayers using Neher-Sakmann pipettes. In: Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motion (Spach, G., ed.).

Elsevier, Amsterdam, pp. 479-485

Wilmsen, H. U., Faulstich, H., Eibl, H. und Boheim, G. (1985)

Phalloysin, a mushroom toxin, forms proton and voltage gated membrane channels.

Eur. Biophys. J. 12: 199-209

Wilmsen, H. U. (1987)

Untersuchungen zum Inkorporationsverhalten und zur Aggregation wasserlöslicher Kanalbildner in planaren Lipidmembranen am Beispiel von Phalloporin aus Amanita phalloides und Rubescensporin aus Amanita rubescens. Dissertation.

Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum

Young, J. D. E., Young, T. M., Lu, L. P., Unkeless, J. C. und Cohn, Z. A. (1982)

Characterization of a membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica.

J. Exp. Med. 156: 1677-1690

Zampighi, G. A., Hall, J. E. und Kreman, M. (1985)

Purified lens junctional protein forms channels in planar lipid films.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8468-8472

Diese Arbeit entstand an der Ruhr-Universität Bochum, Abteilung Biologie, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Boheim. Ihm besonders möchte ich für die sachkundige Beratung und wohlwollende Förderung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H. Faulstich vom Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg möchte ich für die Bereitstellung des Pilzmaterials sowie einiger aufgereinigter Proteinpräparationen danken.

Viele Mitarbeiter der Arbeitsgruppe haben mich hilfreich unterstützt, mein besonderer Dank gilt S. Aßhoff, A. Balzer, H. Bartel, B. Borutta, S. Gelfert-Peukert, W. Hanke, R. Krumm, J. Ströttchen, U. Wilmsen und J. Zwocyk.

L e b e n s l a u f

Persönliche Angaben

Name	Inge Helbig
Geburtsdatum und -ort	22. Dezember 1958 in Essen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1965 - 1968	Städt. Gemeinschaftsschule, Essen
1968 - 1974	Bertha-Krupp-Realschule, Essen
1974 - 1977	Alfred-Krupp-Gymnasium, Essen
6. Juni 1977	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1977 - 1983	Studium an der Ruhr-Universität Bochum
	Fachrichtung: Biologie
6. September 1983	Abschluß: Diplom-Biologin
seit September 1983	Promotion an der Ruhr-Universität Bochum

